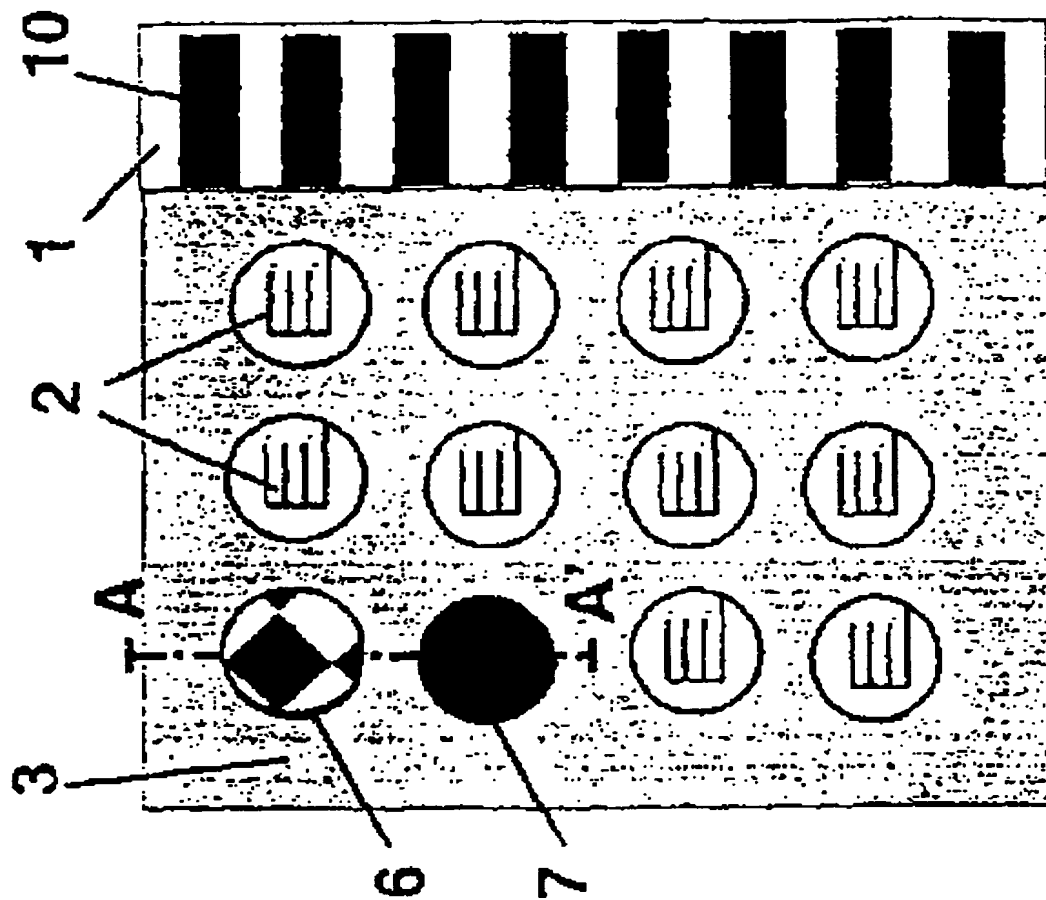


AN: PAT 2000-673582 .
TI: Versatile electrochemical detector array for laboratory application comprises e.g. computer-addressable noble metal ultra-micro electrodes on silicon plate for molecular assay and investigation of charged molecule transport
PN: DE19916921-A1
PD: 19.10.2000
AB: NOVELTY - A versatile electrochemical detector array comprising computer-addressable noble metal ultra-microelectrodes (electrodes) on a silicon plate, is new. Sensor locations on plates comprise spaced arrays of ultra-microelectrodes and optionally-arranged auxiliary electrodes. DETAILED DESCRIPTION - A versatile electrochemical detector array comprising computer-addressable noble metal ultra-micro electrodes on a silicon plate, is new. Sensor locations on plates comprise spaced arrays of ultra-microelectrodes (electrodes) and optionally-arranged auxiliary electrodes. Each position is addressable and electrochemically monitored. As required, alternating or steady electrical fields are produced at each. Individual detection of diverse electrochemical reactions or characteristics, or electrical read-out of such prior events, takes place at each sensor location. Differing or similar molecules forming an affinity, are immobilized as required at sensor positions, or on particular carriers, or in gels at the sensor locations, independently of optical characteristics.; USE - The ultra-microsensor electrode array on e.g. silicon plates has numerous potential applications in the laboratory, such as for detection of various molecules and mixtures in biochemical analysis, medicinal diagnosis and environmental monitoring. ADVANTAGE - The array is especially suitable for biochemical affinity assays and is readily constructed using modern semiconductor processing technology. Different analytes can be determined simultaneously. Serial readout is achieved, avoiding interference with the measurement process, using a method particularly compatible with computer technology. Miniaturization, manufacturing and handling advantages are realized. Analytic handling of molecular biological assays is improved. Optical techniques are not invoked. DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows an electrochemical detector array in plan view. carrier plate 1 contact surfaces 2 electronic addresser/decoder 10
PA: (FRAU) FRAUNHOFER GES FOERDERUNG ANGEWANDTEN;
IN: ALBERS J; BERNT H; DEHORST R; HINTSCHE R; SEITZ R; BREDEHORST R;
FA: DE19916921-A1 19.10.2000; EP1200817-A2 02.05.2002; WO200062047-A1 19.10.2000; WO200062048-A2 19.10.2000; DE10080029-T 13.09.2001;
CO: AL; AT; BE; CH; CY; DE; DK; EP; ES; FI; FR; GB; GR; IE; IT; JP; LI; LT; LU; LV; MC; MK; NL; PT; RO; SE; SI; US; WO;
DN: JP; US; DE;
DR: AL; AT; BE; CH; CY; DE; DK; ES; FI; FR; GB; GR; IE; IT; LI; LT; LU; LV; MC; MK; NL; PT; RO; SE; SI;
IC: G01N-027/02; G01N-027/403; G01N-027/416; G01N-027/447;
MC: B04-B03C; B04-C03B; B04-E01; B05-A03B; B05-B02C; B05-C06; B11-C08B; B12-K04; D05-H09; D05-H10; J04-B01; L04-C10E; L04-C11C; L04-E; S03-E02; S03-E03; S03-E03E; U12-B03E; U14-H01B;
DC: B04; D16; J04; L03; S03; U12; U14;
FN: 2000673582.gif
PR: DE1016921 14.04.1999; DE1080029 14.04.2000;
FP: 19.10.2000
UP: 07.06.2002





①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 16 921 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
G 01 N 27/416
G 01 N 27/447
G 01 N 27/02

②1 Aktenzeichen: 199 16 921.7
②2 Anmeldetag: 14. 4. 1999
④3 Offenlegungstag: 19. 10. 2000

DE 199 16 921 A 1

⑦1 Anmelder:
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung eV, 80636 München, DE

⑦4 Vertreter:
Leonhard Olgemöller Fricke, 80331 München

⑦2 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Elektrisches Sensorarray

⑤7 Für die Anwendung in der analytischen Biochemie, der Diagnostik und der Umweltüberwachung werden elektrische Sensorarrays basierend auf voltametrischen und/oder impedimetrischen Detektionsprinzipien mit serieller oder paralleler Auslesung benutzt. Das elektrische Sensorarray mit Ultramikroelektroden in sub- μ m-Dimensionen wird zur elektrochemischen Detektion biomolekularer Assays benutzt. Die gleiche Elektrodenanordnung erlaubt erfindungsgemäß sowohl elektrochemische Meßvorgänge als auch die Applikation elektrischer Felder zur Handhabung geladener Moleküle. Jede Arrayposition ist individuell adressierbar, elektrochemisch kontrollierbar und für individuelle elektrische Auslesung sowie wahlweise Zwischenspeicherung geeignet. Erfindungsgemäß wird dies entweder mit direkter Kontaktierung zu separater Meß- und Steuerelektronik oder durch integrierte CMOS-Schaltungen an jeder Arrayposition realisiert. Neben den multiplen Ultramikroelektroden zur Detektion, die paarweise als Interdigitalelektroden oder als spiral- bzw. kreisförmige Bänder oder mit punktförmigen Elektroden besetzte Flächen ausgebildet sind, werden bedarfsweise unterschiedliche Hilfselektroden angeordnet. Für biomolekulare Assays werden an jeder Sensorposition auf oder zwischen den Elektroden oder auf Hilfsflächen immobilisiert. Die affinitätsbindenden Moleküle können auch an feste Träger gebunden sein und an den Sensorpositionen lokalisiert werden. Nach Affinitätsbindung von Analyten aus Stoffgemischen wird an ...

DE 199 16 921 A 1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein elektrisches Sensorarray, das aus multiplen Ultramikroelektroden als elektrochemischen Transduktoren besteht und zum gleichzeitigen Nachweis von verschiedenen Molekülen aus Substanzgemischen in der biochemischen Analytik der medizinischen Diagnostik und der Umweltüberwachung als Teil von Meßanordnungen verwendet wird. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung des analytischen Prozesses.

Grundlagen der Erfindung

Für die analytische Untersuchung biochemischer Assays ist es erwünscht, mehrere Analyte gleichzeitig in sogenannten Arrayanordnungen zu detektieren. Solche Arrays sind auf der Basis optischer Detektion weit verbreitet. Es wäre von Vorteil, direkt elektrische Meßsignale ohne Umweg über optische Detektionshilfen zu erfassen und auf diese Weise partikel tolerant und volumenunabhängig zu messen. Die elektrische Detektion würde Preisvorteile und robustere Handhabung ermöglichen.

Ausgehend vom klassischen Elektrodenystem zur elektrochemischen Detektion gibt umfangreiche Bemühungen, Elektroden zu miniaturisieren. Mit dem Begriff bezeichnet man üblicherweise elektrochemisch genutzte Elektrodenstrukturen in Dimensionen unter 5 µm. R. M. Wightman und D. O. Dipp beschreiben Möglichkeiten der Voltametrie an Ultramikroelektroden in *Electroanalytical Chemistry*, Ed. A. J. Bard (Marcel Dekker, New York 1988) Vol. 15, p. 267.

Solche Ultramikroelektroden ermöglichen auch besondere Detektionsverfahren wie das Redox-Recycling [O. Niwa et al., *Electroanalysis* 3 (1991) 163-168], das besonders für biochemische Affinitätsassays mit Enzymmarkierung, wie sie bei Immuno- und DNA-Assays üblich sind, vorteilhaft eingesetzt werden kann. Elektrodenstrukturen unter 300 nm Strukturweiten ermöglichen die markierfreie Detektion der Affinitätsbindung großer Moleküle an elektrodengebundene Fängermoleküle mittels der Impedanzspektroskopie [DE 196 10 115].

Ein Paar planarer Interdigitalelektroden für konduktometrische und voltametrische Messungen bezeichnen Sheppard et al. in *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1202 als Array.

Ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden in Siliziumtechnologie verwendeten Aoki et al. [*J. Elektroanal. Chem.*, 79 (1997) 49] für reversible Redoxreaktionen, das sogenannte Redox-Recycling.

Wiederum ein einzelnes interdigitales Elektrodenpaar wurde von H. T. Tang et al. [*Anal. Chimica Acta*, 214 (1988) 187] als Detektorsystem für ein Immunoassay, bestehend aus einem Antigen und einem Antikörper genutzt.

Alle diese Anordnungen wurden aber nur zur Einzelanalytbestimmung beschrieben, so daß arraytypische unterschiedliche Molekülspezies nicht einzeln elektrisch detektiert werden konnten.

Mikroelektrodenarrays mit 16 parallelen Bandedelektroden und 0,1 mm Elektrodenbreite wurden von Aoki et al. *Anal. Chem.* 64 (1992) 44 zur elektrochemischen Detektion beschrieben. Dabei werden unterschiedliche Polarisationsspannungen an den einzelnen Bandedelektroden angelegt und konstant gehalten. Die Elektroden werden seriell im msec-Takt ausgelesen, ohne daß den Einzelelektroden Schalter zugeordnet sind. Ein Tiefpaßfilter verhindert das Auftreten von Ladeströmen. Diese Anordnung ermöglicht nur die Detektion einzelner oder verschiedener elektrodenaktiver Spezies in Lösung.

zies in Lösung.

Eine Weiterentwicklung interdigitaler Elektrodenpaare zu einem Array mit multiplen interdigitalen Elektroden wurden in DE 43 18 519 zum simultanen Betrieb an einem Multipotentioinstaten angegeben. Bei diesem Verfahren werden die Potentiale an den Elektroden individuell kontrolliert und konstant gehalten. Das Array ist auch nur zur simultanen und parallelen Messung eines Analyten in Lösung geeignet. Ebenfalls mit einem Multipotentioinstaten wurden 4 Felder mit punktförmigen Mikroelektroden parallel zur Bestimmung verschiedener Metalle mittels anodischem Stripping-Verfahren beschrieben (DE 44 24 355 C2). Das Verfahren erlaubt nur die spezielle Stripping-Voltametrie als Detektionsverfahren, wobei mit Hilfe der Square-wave-Voltametrie Spannungsrampen aufmoduliert wurden.

Das Prinzip einer voltametrischen parallelen Multikanalmessung an Mikroelektrodenarrays ist in *Electroanalysis* 8, 10 (1996) 891, aufgezeigt. Ein Elektrodenarray mit 1 bis 2 µm großen Querschnitten von eingebetteten Kohlefasern benutzten T. G. Strein und A. G. Ewing [*Analytical Chemistry* 65 (1993) 1203]. Beide Verfahren gestatten keine serielle elektrische Abfrage verschiedener Sensorpositionen.

Yon Hin et al. [*Sensors and Actuators B* 1 (1990) 550] beschreiben ein Multianalyt-Elektrodenarray bestehend aus mäanderförmigen parallelen Elektrodenbändern zur parallelen Analyse von Glukose und Galaktose mittels Leitfähigkeitsmessung. Dazu wurden Glukoseoxidase und Galaktosidase in leitfähigem Polypyrrol auf den Elektrodenoberflächen einpolymerisiert, gesteuert durch die Elektropolymerisation. Da dieses Array die elektrische Leitfähigkeit als Detektionsgröße nutzt, sind Schaltvorgänge im Hinblick auf Störungen bei der Voltametrie ohne Bedeutung.

Ein nanostrukturiertes Goldelektrodenarray zur Immundetektion wird von C. R. Musiel et al. [*Journal of Vacuum Science and Technology B* 13 (6) (1995) 2781] beschrieben. Dieses Elektrodenarray ist durch das Herauslösen von Nanopartikeln aus einer auf Gold aufgetragenen Isolations-schicht stochastisch verteilt und kann nicht individuell adressiert und ausgelesen werden.

Im US Patent 5,605,662 ist ein Elektrodenarray individuell ansteuerbarer Einzelelektroden mit ca. 30 µm Durchmesser und davon separierten größeren Gegenelektroden auf einem Siliziumchip angegeben. Dieses Array wird nicht zur elektrochemischen Detektion, sondern nur zur Adressierung und Felderzeugung zwischen gelbeschichteten Einzelelektroden und den am Rande dieses Arrays angeordneten Gegenelektroden benutzt. Mit dem erzeugten Feld werden geladene Moleküle auf individuelle Elektrodenpositionen transportiert oder durch entgegengesetzte Polarisierung von diesen Feldern entfernt. Für einen konkreten Fall ist dies für das Anreichern von DNA im Gel über individuellen Elektroden zur DNA-Hybridisierung an Fängern und im umgekehrten Fall das Beseitigen von Mismatches durch Feldunterstützung der DNA-Stringenzbehandlung beschrieben [R. G. Sosnowski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94 (1997) 1119]. Die Anwendung dieses Systems zur molekularbiologischen Multianalytidiagnostik ist in US 5,563,957 beschrieben, wobei der elektrische Transport mit optischer Detektion gekoppelt ist.

Ein Array zur potentiometrischen Anwendung mit mehr als tausend individuell adressierbaren Elektroden-elementen wird von T. Hermes et al. in *Sensors and Actuators B* 21 (1994) 33 beschrieben. Die Einzelpositionen dieses Sensorarrays werden nur zum Zeitpunkt der Auslesung aktiv angeschaltet, während im Nichtlesezustand keine Spannung anliegt und keine Reaktion stattfindet. CMOS-Schalter für dieses An- und Ausschalten der Elektroden sind an jeder Arrayposition individuell angeordnet. Ein analog aufgebautes

Multielektrodenarray mit nMOS-Schaltern an jeder Sensorposition wurde von [Fiaccabrionio G. C. et al. Sensors and Actuators B, 18 19 (1994) 675 beschrieben. Bei dieser Art von Arrays entstehen beträchtliche Ladeströme, die amperometrische Detektionsverfahren stark beeinträchtigen. Ein Array von 19 Iridiumelektroden mit 10 µm Durchmesser als einzeln adressierbare Elektroden beschreiben S. P. Kounaves et al. in Anal. Chem. 66 (1994) 418. Die Elektroden wurden seriell in 2-Elektroden-Technik ausgelesen und nur im Lesezustand mit einem Potential belegt.

Ein Überblick über die Elektrochemie an Ultramikroelektroden ist zu finden in Physical Electrochemistry, Ed. Rubinstein, Marcel Dekker, 1995 New York, p. 131-208.

Die Applikation eines Paares von 20-300 nm-strukturierter Interdigitalelektrodenarrays zur markerfreien Impedanzanalyse einer Molekülkonjugation auf den Elektrodenoberflächen wurde im Patent DE 196 10 115 A1 beschrieben. Ein einzelnes Paar nanostrukturierter Interdigitalelektroden für die Admittanzspektroskopie gelöster Moleküle wurde in J. Vac. Sci. Technol. A 13 (3) (1995) 1755 beschrieben. Das analoge Prinzip der Impedanzmessung im Elektrodenzwischenraum immobilisierter Moleküle mittels eines interdigitalen Paares schattenartig an eine Grubenwand gedampfter Nanometerelektroden ist in der Patentanmeldung PCT/EP 96/05290 gezeigt. Bei allen beschriebenen Impedanzmessungen mit Ultramikroelektroden wurde ein interdigitales Elektrodenpaar in Zweipol-Technik an ein kommerzielles Impedanzmeßgerät angeschlossen.

Eine besondere Form individuell adressierbarer sub-µm-Bandelektrodenarrays sind von M. P. Nagale und I. Fritsch in Analytical Chemistry 70,14 (1998) 2902 als gestapelte, voneinander isolierte Dünnschichtelektroden beschrieben. Dabei sind die Querschnitte der Stapel als aktive Elektroden verwendet worden. Zur elektrochemischen Kontrolle wurde ein kommerzieller computergestützter Potentiostat mit Arbeits-, Referenz- und Gegenelektrode verwendet. Die Auslesung der 15 Elektroden-schichten erfolgte seriell durch An- und Ausschalten.

Ein Mikroelektrodenarray zur extrazellulären Aktivitätsmessung und Stimulation lebender Zellen und neuronaler Gewebe benutzt individuell adressierbare Mikroelektroden von 14 µm im Durchmesser, die mittels eines CMOS VLSI-Chips zur Stimulation und zur Detektion eingesetzt werden, wobei jede Chipelektrode zellulär erzeugte Biopotentiale zwischen 0,9 2,1 mV und 100 400 µV individuell erfassen kann [J. J. Pancrazio et al. Biosensors & Bioelectronics 13 (1998) 971]. Zur Stimulation werden Frequenzen zwischen 0,7 und 50 kHz mit Biasspannungen von 12-16 µV appliziert. Die Elektroden werden seriell im ein- oder ausgeschalteten Zustand betrieben.

Ein Verfahren und Vorrichtung zur Anreicherung und Aufreinigung von Molekülen an großflächigen Elektroden wird im Patent PCT/DE 97/01368 beschrieben. Dabei werden nur geringe Feldstärken erzeugt und keinerlei Detektionsverfahren einbezogen.

Die Modifizierung und Belegung der Oberflächen mit Biomolekülen, wie sie für das elektrische Sensorarray benutzt werden, wird durch kovalente Bindung oder Adhäsion an die metallischen oder nichtmetallischen Oberflächen oder an die Wandungen von Kompartments erreicht. Die Moleküle werden dabei als Monolayer oder Multilayer durch kovalente Anbindung, durch Adsorption, durch Einlagerung in Polymere oder als adhäsive Filme aufgebracht [C. F. Mandenius et al., Methods in Enzymology 137 (1988) 388]. Weit verbreitet ist die Haftschrifterzeugung auf Oberflächen mit funktionalisierten Silanen als Monoschichten [C. M. Fischer et al., Europhysics Letters 28 (2) (1994) 129-134] über gasförmig oder in flüssiger Phase aufgetragene quervernetzten

Schichten [R. A. Williams et al. Biosensors & Bioelectronics 9 (1994) 159]. An diese Silanderivate, die Amino-, Thiol-, Aldehyd-, Hydroxyl-, Carboxyl- oder andere funktionelle Gruppen tragen können, werden meist mit Hilfe von Crosslinking-Techniken [H. G. Bäumert und H. Fasold, Methods in Enzymology, Vol. 172, p. 584] verschiedenste andere Verbindungen mit passenden reaktiven Gruppen kovalent gebunden. Auf diese Weise sind alle als Affinitätsbindende Fängermoleküle geeigneten bioaktiven Substanzen wie Oligonukleotide, Peptide, Haptene und andere auf den Elektrodenflächen zu immobilisieren.

Eine spezifisch die Metalloberflächen nutzende Immobilisierung ist die Ausbildung von Self-assembling-Monoschichten durch Thiol/Goldbindungen. Nach Ausbildung der Self-assembling-Monolayerschicht wird z. B. über Streptavidin/Biotin-Kopplungen die geordnete Anbindung von Proteinen wie Antikörpern erreicht [J. Spinke et al., Langmuir 9 (1993) 1821]. In einem anderen Ansatz werden auf Goldflächen über Chelator-thioalkane, histidinmarkierte Proteine geordnet an die Oberflächen gebunden [D. Kröger et al., Biosensors und Bioelectronics 14 (1999) 155].

Eine weitere Methode zur selektiven Aufbringung organischer Haft- und Kopplungsschichten ist die Elektropolymerisation, beispielsweise für die Bindung von Ferrocenen auf Platinelektroden [G. N. Kamau et al. in Anal. Chem. 66 (1994) 994].

Für die Herstellung biomolekularer Arrays in Mikrodimensionen sind eine Reihe von Verfahren gebräuchlich. Von makroskopischen Auftupfen ist das Aufsetzen miniaturisierter Ringe auf Chipoberflächen abgeleitet, auf die vorher entsprechende Moleküle durch Tauchen aufgebracht wurden [S. D. Rose, J. Ass. Lab. Autom. 3,3 (1998) 53].

Das piezoelektrische Drucken, analog den Tintenstrahldruckern, zum Aufbau von DNA-Chips gelang A. P. Blanchard [Genetic Engineering, Principles and Methods, 20 (1998) 111].

Das sogenannte Mikrokontaktdrucken, d. h. das Übertragen von Molekülen mittels Mikrotempel wurde von A. Kumar und G. M. Whitesides [Appl. Phys. Lett. 63 (1993) 2002] beschrieben.

Eine mit photolithographischen Masken unterstützte Festphasensynthese auf Chip-Mikroarrays, die Nucleotidaufbau mittels Photoaktivierung erlaubt, beschreiben G. Mcgall et al. [Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93 (1996) 13555].

Durch elektrochemische Fokussierung werden nach US 5605662 geladene Moleküle aus der Lösung zu ihren Bindungsplätzen in Gelen über Elektroden transportiert.

Durch perforierte Membranen, die auf Chipoberflächen aufgedrückt werden, sind an den offenen Stellen Immobilisierungsreaktionen an den Oberflächen in flüssiger Phase möglich [E. Ermantraut et al., Proc. of µTAS '98, Alberta, Can., 1998, p. 217].

Die aufgezeigten Verfahren stehen für Standardmethoden, die es erlauben, DNA, Oligonukleotide, Proteine und andere Moleküle auf Arraypositionen zu immobilisieren.

Nachteil aller bisher beschriebenen elektrischen Sensorarray-Anordnungen mit Elektroden als Transducer ist es, daß sie nur zur Monoanalytbestimmung geeignet sind, oder daß die eigentliche sensorische Funktion von zusätzlichen optischen Komponenten übernommen werden muß. Die bisher als Array bezeichneten Elektroden-systeme, z. B. Interdigitalelektroden, stellen keine Arrays im eigentlichen Sinn dar, die zur Multianalytmessung geeignet sind. Bisher ist zudem nicht bekannt, wie man Elektrodenarrays mit den in der Computertechnik üblichen seriellen Verfahren, d. h. nacheinander, auslesen kann, ohne daß dabei die elektrische Doppelschicht, die sich durch Polarisierung an den Elektroden bei voltametrischen Detektionsverfahren aufbaut, ge-

stört wird.

Zur Verbesserung dieser Situation ist also eine Arrayanordnung zur Multianalytmessung notwendig, die eine rein elektrische Sensorfunktionen ermöglicht und die mit elektrischen Steuer- und Meßverfahren ausgeführt werden kann.

Aufgabe der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es insbesondere, ein Sensorarray für biochemische Affinitätsassays zur Verfügung zu stellen, das mit den Methoden der Halbleitertechnologie gefertigt werden kann und als elektrochemischer Transducer meßtechnisch einfache elektrische Signale direkt und ohne optische Komponenten erzeugt. Weiterhin soll ein Meßverfahren zur Verfügung gestellt werden, mit dem aus Stoffgemischen unterschiedliche Analyte gleichzeitig bestimmt werden. Aufgabe ist es weiterhin, ein Verfahren zur seriellen elektrischen Auslesung eines elektrischen Sensorarrays zur Verfügung zu stellen, daß Störungen des elektrischen Meßprozesses vermeidet und technologisch kompatibel zu den Methoden der Computertechnologie ist. Es sollen Miniaturisierungs-, Fertigungs- und Handhabungsvorteile realisiert sowie die verbesserte analytische Handhabung molekularbiologischer Assays aufgezeigt werden.

Erfindungsbeschreibung

Die Erfindung bezieht sich zum einen darauf, daß als sensorisches Element multiple Ultramikroelektroden, d. h. vorzugsweise Elektroden mit typischen Strukturdimensionen unter 1 µm verwendet und als Array angeordnet werden. Die Anordnung der Ultramikroelektroden im Array zielt neben der Miniaturisierung auf ein vorteilhaftes Diffusionsverhalten der zu detektierenden Moleküle und weiterhin auf die Nutzung voltametrischer und impedimetrischer Detektionsverfahren, wie Redox-Recycling und markerfreie Impedanzmessungen, für die derartige Ultramikroelektroden Voraussetzung sind. Die Erfindung bezieht sich ferner auf ein spezielles seriellles Auslesungsverfahren der elektrochemischen Prozesse an den Ultramikroelektrodenarrays. Die erfindungsgemäße Ultramikroelektrodenanordnung bezieht sich gleichermaßen auf die Erzeugung multipler elektrischer Felder mit sehr hohen Feldstärken, die zum aktiven Transport von Molekülen individuell an allen Arraypositionen geeignet sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein elektrisches Sensorarray für die Multianalyt-Messung biochemischer molekularer Assays, welches folgendes umfaßt:

- (a) ein mechanisch stabiles planares Substrat, auf dem als Array mehrere Sensorpositionen, die jeweils aus lokal separierten, mindestens paarweisen Ultramikroelektroden und wahlweise zusätzlichen Hilfselektroden bestehen,
- (b) isolierten Leitungen, die eine individuelle elektrische Adressierung jeder Sensorposition und Einzellektrode gestatten,
- (c) zusätzlichen elektrischen Leitungen, die eine elektrochemische Kontrolle und Steuerung an jeder Position ermöglichen, und wahlweise elektrische Gleich- und/oder Wechselfelder an jeder Sensorposition ermöglichen,
- (d) die Immobilisierung unterschiedlicher oder gleicher affinitätsbindender Moleküle, die entweder auf allen oder ausgewählten Oberflächen der einzelnen Sensorpositionen direkt oder an partikulären Trägern oder gelartigen Substanzen gebunden oder eingeschlossen

sind und die individuell über den einzelnen Sensorpositionen angeordnet werden,

(e) integrierte elektronische Funktionselemente, die die individuelle Kontrolle elektrochemischer Reaktionen an den einzelnen Sensorpositionen und unabhängig davon die individuelle elektrische Messung dieser Reaktionen an jeder Position gestatten, wobei die elektronischen Schaltelemente Gruppen, Reihen oder Einzelpositionen der Sensorarrays zugeordnet sind.

Die Erfindung ermöglicht durch diese aktiven Schaltelemente eine serielle, d. h. nacheinander erfolgende, elektrische Auslesung der elektrochemischen Prozesse an einzelnen Sensorpositionen. Die aktiven Schalt-, Steuer- und Auslesefunktionen an jeder Arrayposition werden so ausgeführt, daß die elektrische Doppelschicht, die sich bei elektrochemischen Prozessen an Elektroden ausbildet, nicht gestört wird. Intelligente elektronische Funktionselemente als separate Bauelemente oder direkt an den einzelnen Sensorarraypositionen ermöglichen es außerdem, elektrochemische Prozesse an einer Sensorposition in den Zeiten zwischen den Auslesungen aufzuzeichnen und zwischenspeichern.

Mit der Erfindung wird ein elektrisches Sensorarray zur Verfügung gestellt, das durch die variable Anzahl spezifischer Sensorarraypositionen für unterschiedliche Analyte erlaubt, unterschiedliche analytische Fragestellungen zu lösen. Darüber wird erfindungsgemäß ein Verfahren aufgezeigt, das es ermöglicht, mit den zur Detektion verwendeten Ultramikroelektroden partikeltolerant, d. h. unabhängig von optischen Eigenschaften in sub-µl-Volumina pro Arrayposition zu messen.

Von Vorteil ist weiterhin die Herstellung des Sensorelements mit waferorientierten Technologien der Halbleiterindustrie, die auch kompatibel zu den Verfahren für die Immobilisierung bzw. Beladung von biochemischen affinitätsbindenden Erkennungsmoleküle auf den Arraypositionen sind.

Eine besondere erfindungsgemäße Variabilität der Anordnungen und Verfahren wird im einzelnen durch die folgenden Maßnahmen erreicht:

- Bei weniger als ca. 50 elektrische Sensorpositionen im Array werden die Ultramikroelektroden durch direkte metallische Leiterbahnen unter einer Isolationschicht zu Kontaktflächen geleitet. Als planare Substrate finden für diese Applikation Silizium, Glas, Keramik oder Polymere vorteilhafte Verwendung.
- Sowohl geringe als auch große Zahlen von Sensorpositionen pro Array werden durch Integration der Ableitungen mittels Si-Chip-Technologie realisiert. Silizium als planares Trägerelement wird insbesondere auch dann verwendet, wenn eine größtmögliche dichte Anordnung von einzelnen Sensorelementen bzw. Positionen erreicht werden soll.
- Als Träger für das elektrische Sensorarray wird Silizium auch verwendet, weil es die Anwendung einer effizienten Technologie gestattet und insbesondere dann unabdingbar ist, wenn zur individuellen Kontrolle der Positionen des Sensorarrays Steuerung und Schaltung sowie Auslesung der einzelnen Positionen zusätzliche elektronische Elemente wie Transistoren, Dioden, Widerstände und andere übliche elektronische Komponenten positionsbezogen integriert werden.
- Sowohl bei den elektrischen Sensorelementen mit direkter Kontaktierung als auch bei jenen mit integrierten elektronischen Elementen an den individuellen Sensorpositionen wird erfindungsgemäß ein neues Verfahren zur unabhängigen Kontrolle und seriellen elektrochemischen Detektion an den Sensorpositionen be-

nutzt. Für die elektrochemische Detektion werden dazu durch Elektrodenpolarisation erzeugte elektrische Doppelschichten an den Elektrodenoberflächen kontinuierlich an alle Sensorarraypositionen appliziert. Erreicht wird dies durch besondere Umschalter, die verhindern, daß durch serielle, d. h. nacheinander erfolgende elektrische Auslesung der einzelnen Arraypositionen, diese Polarisation gestört wird und keine sogenannten Umladungsprozesse auftreten.

Ein besonderer Nutzen entsteht dadurch, daß die zur Detektion verwendeten Ultramikroelektroden und wahlweise weitere Hilfselektroden gleichzeitig sowohl als Elemente zur Ausführung elektrophoretischer Transportvorgänge der Analytmoleküle zu den Orten affinitätsbindender Partnermoleküle als auch zur Beseitigung unerwünschter Bindungsereignisse eingesetzt werden.

Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt ein Array mit interdigitalen Ultramikroelektroden mit paarweisen Mikroelektroden und Details einzelner Sensorpositionen;

Fig. 2 zeigt Anordnungen und Kombinationen verschiedener Formen von Ultramikroelektroden und Hilfselektroden einer einzelnen Arrayposition;

Fig. 3 zeigt ein Schema eines Arrays von Paaren interdigitaler Ultramikroelektroden mit aktiven CMOS-Schaltelementen zur Adressierung und Kontrolle der individuellen Elektrodenpolarisation sowie externen Lese- und Meßverstärkern;

Fig. 4 zeigt ein Schema eines Arrays von Paaren interdigitaler Ultramikroelektroden mit aktiven CMOS-Schaltelementen zur Adressierung und Kontrolle der individuellen Elektrodenpolarisation sowie externen Lese- und Meßverstärkern, mit Kontrollverstärker, Lese- und Steuereinrichtungen an jeder Arrayposition; und

Fig. 5 zeigt ein Schema der Anordnung von Arrayelektroden und integrierten-CMOS-Elementen.

Numerierung der Abbildungen

- 1 planarer Träger
- 1s Siliziumsubstrat
- 2 Kontaktflächen
- 3a ringförmiges Ultramikroelektrodenarray
- 3a' ringförmiges Ultramikroelektrodenarray
- 3b Hilfselektrode
- 3c Hilfselektrode
- 3, 3' interdigitales Ultramikroelektrodenpaar
- 3d, 3d' interdigitalelektrodenpaar
- 3e, 3e' Hilfselektrodenpaar
- 3f, 3f' Ultramikroelektrodenarray
- 3g, 3g' interdigitalelektrodenpaar mit Ultramikroelektrodenarray
- 3h, 3h' Elektrodenpaar mit Ultramikroelektrodenarrays
- 3i, 3i' mäanderförmige Ultramikroelektroden
- 3j Hilfselektrode
- 4 Areale der Sensorarraypositionen
- 5 Abdeckung der Elektrodenzuleitungen und Steuerleitungen
- 6 Metallische Leitungsbahn zu den Elektroden
- 7 Siliziumdioxid
- 8 Kompartimentmaterial
- 9 punktförmige Ultramikroelektroden
- 10 elektronische Vorrichtung zur Adressierung und Decodierung

11 elektronische Vorrichtung mit Leseverstärkern

12 integrierte Schaltung im adressierten Zustand

12a Durchkontaktierung

13 integrierte Schaltung im nicht adressierten Zustand

13a Durchkontaktierung

14 aktive Adressleitung A

15 aktive Adressleitung A'

16 inaktive Adressleitung B

17 inaktive Adressleitung B'

18 Meßleitung C

19 Meßleitung D

20 Bias-Leitung E

21 Bias-Leitung F

22 adressierte integrierte Lese-, Verstärker- und Speicherelektronik

23 nicht adressierte integrierte Lese-, Verstärker- und Speicherelektronik

24 CMOS-Wanne

25 Source

26 Drain

27 CMOS-Aluminium

28 CMOS-Dielektrikum

29 flüssigkeitsresistente Passivierung

30 Goldelektrode

31 Polysilizium-gate

32 Kreuzung von Adressleitung und Meßleitung

In Fig. 1a ist ein Siliziumchip dargestellt, bei dem auf jeder Arrayposition 4 jeweils 1 Paar ringförmiger Mikroelektroden 3a und 3a' angeordnet sind, die durch direkte Leiterbahnen zu elektrischen Verbindungskontaktflächen 2 am Rande des Chips verlaufen. In Fig. 1b ist eine Detailvergrößerung des Chips des Arrayelementes aus Fig. 1a im Schnitt PP' dargestellt. Von jeder Arrayposition 4 werden die Ringelektroden 3a und 3a' zu jeweils einer individuellen Kontaktfläche 2 am Rande des Chips über die Leitungen 6 geführt. Die Leiterbahnen 6 sind dabei von einer flüssigkeitsdichten Isolationsschicht 5 bedeckt. Ein Querschnittsdetail dieser Abbildung entlang der Schnittlinie A, A' ist in Fig. 1c und 1d dargestellt. Auf dem Silizium-Substrat 1 ist eine isolierende Schicht aus Siliziumdioxid 2 aufgebracht, die die Elektrodenarrays 3a und 3a' sowie die Leiterbahnen 6 als Dünnschichtmetallstrukturen trägt. Durch die isolierende Abdeckung 5 werden die Leiterbahnen 6 bedeckt, während die aktiven Sensorelemente 3a und 3a' in den Arraypositionen 4 frei bleiben. Die Abdeckung 5 dient auch zur Abgrenzung zwischen den Elektroden der einzelnen Arraypositionen. In Fig. 1d ist der analoge Querschnitt AA' dargestellt mit einer zusätzlichen Polymerschicht 8, die zur Ausbildung von Mikrokompartmenten oder Distanzringen an den Arraypositionen mit den Ringelektroden 3a und 3a' dienen.

In Fig. 2 sind einzelne Arraypositionen 4 mit verschiedenen Anordnungen der Ultramikroelektroden und Hilfselektroden dargestellt. Fig. 2a zeigt im Detail ein Paar ringförmige Ultramikroelektroden 3a und 3a' mit den Ableitungen 6 auf einer Arrayposition 4. In Fig. 2b sind ringförmige Bandelektroden 3a und 3a' sowie 3c angeordnet und zusätzlich eine zentrale kreisförmige Hilfselektrode 3b im Zentrum dieser Bandelektroden. Fig. 2c zeigt im Detail ein Paar Ultramikroelektroden 3 und 3' mit den Ableitungen 6 auf der Arrayposition. Fig. 2d zeigt 2 Paare interdigitaler Ultramikroelektroden unterschiedlicher Geometrie mit schmalen Elektrodenstrukturen 3 und 3' und vergrößerten Strukturen 3d und 3d' mit individuellen Ableitungen 6. In Fig. 2e ist ein interdigitales Ultramikroelektrodenpaar 3 und 3' mit 2 metallischen Hilfselektroden 3e und 3e' angeordnet. Fig. 2f zeigt ein Paar interdigitaler Ultramikroelektroden 3 und 3' und zwei flächige Hilfselektroden 3f und 3f', die von der iso-

lierenden Schicht 5 bedeckt sind. In dieser Abdeckung 5 sind punktförmig aktive Elektrodenflächen 9 freigelegt, die parallel geschaltet sind. In Fig. 2g ist ein interdigitales Elektrodenpaar 3g und 3g' mit analogem Aufbau wie die Elektroden 3f und 3f' dargestellt. Die punktförmigen Elektroden 9 sind entsprechend der Fingerstruktur elektrisch miteinander verbunden. Fig. 2h ist ein Paar flächiger Elektroden 3h und 3h' angeordnet, die ebenfalls von einer Abdeckschicht 5 bedeckt sind, und Öffnungen mit aktiven punktförmigen Elektroden 9 aufweisen. In Fig. 2i ist ein mäanderförmiges Elektrodenpaar 3i und 3i' mit einer flächigen Hilfselektrode 3j kombiniert.

In Fig. 3 ist ein Array mit Paaren von interdigitalen Ultramikroelektroden gezeigt, wo Adressierung und Steuerung der Elektrodenpolarisation durch CMOS-Schalter 12, 13 im Siliziumchip 1 an jedem einzelnen Interdigitalsystem 3 und 3' angeordnet sind. Die flüssigkeitsdichte Abdeckung 7 liegt über dieser Schalterebene. Die Ableitungen 6 in der Ebene der Ultramikroelektroden führen an den Stellen 12a und 13a durch Öffnungen in der isolierenden Abdeckschicht 7 (Fig. 1) zu der Ebene der CMOS-Schalter. Von einer auf dem Silizium-Chip angeordneten elektronischen Adressiereinheit 10 werden die Adressleitungen 14 und 15 bzw. 16 und 17 angesteuert. Die Schalter 12 zeigen die aktivierte Stellung beim Auslesen einer Spalte von Ultramikroelektroden-Paaren. Die adressierten Ultramikroelektroden sind mit den Meßleitungen 18, 19 verbunden. Die Leitungen 18, 19 führen zu einem Leseverstärker 11. Die Schalter 13 sind in Ruhestellung, die nicht adressierten Ultramikroelektroden sind mit den Bias-Leitungen 20, 21 verbunden.

In Fig. 4 ist ein Sensor-Array mit Paaren von interdigitalen Ultramikroelektroden gezeigt, das der Anordnung nach Fig. 3 entspricht. Die oval umrandeten Bereiche 22, 23 sind elektronische Schaltungen mit Integratoren als Meßwertspeichern, welche die Stromwerte der benachbarten Ultramikroelektroden 3, 3' speichern. In den Gebieten 23 wird über die Adressleitungen 16, 17 das Signal zur Durchführung der Integration angelegt und die Ultramikroelektroden mit den Bias-Leitungen 20, 21 verbunden. In den Bereichen 22 ist durch die Signale der Adressleitungen 14, 15 die Ausgangsspannung des Integrators an die Meßleitungen 18, 19 gelegt.

In Fig. 5 ist in Silizium 1s als planarem Träger eine CMOS-Wanne 24 mit Source 25 und Drain 26 integriert. Ein Gate und Leiterbahnen aus Polysilizium 31 verbinden zusammen mit CMOS-Aluminium 27 im CMOS-Dielektrikum 28 die chipinternen Elemente. Ebenfalls mittels Aluminium ist die Source 25 mit der Goldelektrode 30 durch eine flüssigkeitsdichte Siliziumnitrid-Passivierung 29 hindurch elektrisch verbunden. Im Kreuzungsbereich 32 kreuzen sich z. B. Leiterbahnen wie die Adressleitungen 15 mit Meßleitung 18 gemäß Fig. 4.

Ausführliche Erfindungsbeschreibung/bevorzugte Anordnungen

Für die Konstruktion des elektrischen Sensorarrays werden planare Träger bzw. Substrate aus verschiedenen Materialien verwendet. Ein besonders günstiges Material ist Silizium, weil mit den eingeführten technologischen Methoden der Halbleiterfertigung die erfindungsgemäßen Ultramikroelektrodenarrays in Dünnschichttechnologie und in Waferprozessen hergestellt werden können. Diese Methode ist variabel und preisgünstig, wenn Arraypositionen mit geringer Dichte, d. h. ca. 10-30 Arraypositionen pro elektrisches Sensorarray hergestellt werden sollen, so daß wie in Fig. 1 dargestellt, die Ultramikroelektroden durch isolierte direkte Kontaktierung mit Kontaktflächen am Rand der Chips ver-

bunden werden.

Wenn zur Ansteuerung der individuellen Positionen des Sensorarrays Steuerung und Schaltung sowie Auslesung der einzelnen Positionen zusätzliche elektronische Elemente wie Transistoren, Dioden, Widerstände und Kondensatoren integriert werden, wie in Fig. 3 und 4 dargestellt, ist die Siliziumtechnologie unerlässlich. Silizium als planares Träger-element wird insbesondere auch dann verwendet, wenn mehr als ca. 60 Arraypositionen pro Sensorelement oder eine sehr dichte Anordnung dieser Positionen erreicht werden soll.

Im Falle direkter elektrischer Kontaktierung ist die Verwendung von Glas und glasähnlichen Substanzen sowie Keramik und auch den besonders verschiedenen Arten von Polymeren als planare Träger möglich. Alle Substrate müssen dabei die Eigenschaft aufweisen, daß metallische Leiterbahnen und die strukturierten Ultramikroelektroden auf ihnen haftfest aufgebracht werden können. Das halbleitende Silizium wird durch dünne Schichten aus Siliziumdioxid oder Siliziumnitrid oder deren Gemische isoliert. Auf den Einzelpositionen des elektrischen Sensorelements werden die Ultramikroelektroden und bedarfsweise Hilfselektroden oder Hilfsflächen aus Metallen durch Aufdampfen oder Aufputtern von Edelmetallfilmen wie Gold, Platin oder Iridium aufgebracht und üblicherweise durch photolithographische Prozesse und/oder Naß- bzw. Trockenätzen strukturiert. Mit Hilfe dünner Haftsichten aus Chrom oder Titan oder Tantal oder anderen ähnlichen Metallen wird die Haftung dieser Edelmetalle zum planaren Substrat verbessert. In besonderen Ausführungsformen werden nm-strukturierte Ultramikroelektroden in die Isolatorschichten eingelegt und damit zum Zwecke hoher Chipausbeuten und Kurzschlußfestigkeit planarisiert.

Die für die Detektion verwendeten Ultramikroelektroden, gemäß Fig. 2 sind mindestens paarweise angeordnet und können als interdigitale Ringstrukturen 3a, 3a', 3b, 3c, als interdigitale Strukturen verschiedener Geometrien 3, 3', 3d, 3d', 3g, 3g' in einfacher oder mehrfacher Ausführung oder auch als Mäander 3i, 3i' angeordnet sein. Sie können zusammen mit Flächen diskförmiger Ultramikroelektroden sowie auch zusammen mit Hilfselektroden in verschiedensten Kombinationen benutzt werden.

Die bandförmigen Elektrodenstrukturen, die paarweise als kreis- oder spiralförmige oder interdigitale oder mäandrische Anordnungen ausgeführt sind, werden bevorzugt für das Redox-Recycling als Detektionsverfahren benutzt und photolithografisch in Dimensionen zwischen 200 nm und 800 nm gefertigt, sind aber prinzipiell auch sowohl in größeren als auch in kleineren Dimensionen geeignet.

Analoge Elektrodenstrukturen unter 500 nm Strukturbreiten, bevorzugt zwischen 100 und 300 nm, werden zur markfreien Detektion der Affinitätsbindung großer Moleküle an die elektrodengebundenen Fängermoleküle mittels Impedanzspektroskopie gefertigt.

Eine besondere Eigenschaft der bandförmigen paarweisen Ultramikroelektroden-Strukturen und auch der in großer Nähe angeordneten zusätzlichen Elektroden ist die Erzeugung hoher elektrischer Felder mit Feldstärken bis zu mehreren Megavolt pro m mit relativ geringen Spannungen von typischerweise 0,5 bis 20 V. Die elektrischen Felder zwischen sub-µm-Elektroden verlaufen nur in aller nächster Nähe der Elektroden und durchdringen damit bevorzugt die aufliegenden Molekülschichten, erfassen aber vergleichsweise wenig von der umgebenden Elektrolytlösung.

Dies wiederum gestattet, einen elektrophoretischen Transport von Molekülen schon mit Spannungen von wenigen Volt und damit einem erheblich niedrigeren Spannungsbedarf als bei den sog. Makroelektroden mit Abmessungen

typischerweise über 10 µm zu realisieren. Auch durch höhere Spannungen hervorgerufene störende Vorgänge wie Elektrolyse, pH-Gradientenerzeugung u. a. werden auf diese Weise reduziert oder verhindert.

Bei mehrfacher Anordnung paarweiser Ultramikroelektroden, wie in Fig. 2b gezeigt, ist eine wahlweise Felderzeugung zwischen den verschiedenen Elektroden möglich. Auch die Möglichkeit von Differenz- oder Brückenschaltungen bei der elektrochemischen Detektion ergibt meßtechnische Vorteile zur Kompensation von Störungen. So sind die in Fig. 2d dargestellten zwei Paare interdigitaler Ultramikroelektroden mit unterschiedlichen Geometrien für Differenzschaltungen auf Grund unterschiedlicher Detektionseigenschaften, wie die Amplifikationsrate beim Redox-Recycling, geeignet.

Auch unterschiedliche organische Beladungen erfüllen diesen Zweck einer Differenzmessung. Mittels Abdeckung eines Paares durch galvanische Abscheidung von nicht Self-assembling-Monoschichten ausbildenden Metallen, wie z. B. Nickel o. a., wird eine Immobilisierung verhindert. Auch nachträgliche individuelle Entfernung der Immobilisierungsschicht auf einer Elektrode z. B. durch Desorption einer Self-assembling-Schicht mittels elektrischer Oxidation auf einem dieser Elektrodenpaare kann für solche Differenzmessungen genutzt werden.

Die Erzeugung 1–2 µm großer punktförmiger Ultramikroelektroden 9 auf den in der übrigen Fläche isolierten Arrays, wie in Fig. 2f, 2g und 2h dargestellt, dient optimaler hemisphärischer Diffusion von elektrodenaktiven Partikeln zu den Elektrodenflächen. Diese hemisphärische Diffusion bewirkt an den punktförmigen Elektroden eine mehr als zehnfach höhere Stromdichte pro Fläche sowohl bei der Detektion als auch bei der Applikation von elektrischen Feldern verglichen mit Makroelektroden.

In einer besonderen Ausführungsform können diese punktförmigen Elektroden wie auch die handförmigen Elektroden gemäß Fig. 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2h und 2i von einer dünnen Isolatorschicht auf einer oder beiden Elektroden eines Paares bedeckt sein und damit ein besonderes Meßelement zur Kapazitätsmessung immobilisierter oder an die Oberfläche anbindender Moleküle darstellen. Gleichmaßen ist durch solche Isolierung eines von zwei Paaren von Ultramikroelektroden eine Differenzmessung möglich.

Die Kombination eines Ultramikroelektrodenpaares mit flächenförmigen Hilfselektroden wie in Fig. 2e dargestellt, wird verwendet zur Vergrößerung metallischer Bindungsflächen zur Immobilisierung von Molekülen. Gleichzeitig können diese Flächen wie 3e und 3e', aber auch zur Applikation von elektrischen Zusatzfeldern benutzt werden, um beispielsweise Moleküle in die Nähe der Detektionselektroden 3 und 3' zu transportieren oder bei der Beseitigung von unerwünschten Molekülen Feldunterstützung zu ermöglichen. In Fig. 2f ist die Kombination eines interdigitalen Ultramikroelektrodenpaares mit Hilfselektroden 3f, 3f' gezeigt, die mit den beschriebenen punktförmigen Elektroden besetzt sind. Dabei werden die für band- und punktförmige Elektroden vorstehend beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften der Ultramikroelektroden kombiniert.

In einer besonderen Ausführungsform, wie in Fig. 2h dargestellt, werden flächenförmige Elektroden mit ultramikroelektrodenförmigen Punkten 9 besonders zur Anwendung für die Impedanzspektroskopie benutzt. Dabei können immobilisierte Moleküle sowohl über den gesamten Elektrodenflächen oder in den Zwischenräumen oder auf den aktiven Elektrodenoberflächen spezifisch gebunden sein. In einer anderen Ausführungsvariante werden die Moleküle auf den vorgenannten dünnen Isolatorschichten über den Elektroden immobilisiert.

Weitere Kombination von Elektrodenformen und damit deren Eigenschaften wie z. B. die Doppelanordnung der Elektrodenpaare 3, 3' oder die Kombination von 3a, 3a' mit 3e, 3e' oder 3e, 3e' mit 3g, 3g' und andere sind dabei möglich.

Eine besondere Ausführungsform sind die ringförmigen Ultramikroelektroden 3a, 3a' in Fig. 1, 2a und 2b, die im Prinzip analoge Eigenschaften wie die Paare interdigitaler Mikroelektroden 3 und 3' zeigen, aber effektiver die Ausnutzung der Sensorarrayfläche gestatten und die Applikation zentraler 3b und äußerer Hilfselektroden 3c ermöglichen, die für Feldverteilung und Felderzeugung von Bedeutung sind. Mit letzterer Anordnung läßt sich ein käfigähnliches Feld über z. B. zeitweise inaktiven Elektroden 3a, 3a' erzeugen und gezielt Moleküle in diesen Bereich hereinziehen oder abstoßen.

Die in Fig. 2i dargestellten mäanderförmigen Elektroden 3i und 3i' entsprechen in ihren Eigenschaften den ringförmigen- und den interdigitalen Bandlektroden und können ebenso mit den Hilselektroden 3j für Differenzmessungen oder zur Felderzeugung kombiniert werden.

Eine spezielle, nicht in den Abbildungen dargestellte Form bandförmiger Elektroden ist die spiralförmige Anordnung der Ultramikroelektroden, bei denen parallele Elektrodenbänder von außen nach innen oder von innen nach außen laufen und zu getrennten Kontaktleitungen führen. Auch die spiralförmigen Ultramikroelektroden können wieder mehrfach als Paare mit unterschiedlichen Geometrien kombiniert werden, gegebenenfalls auch mit zusätzlichen Hilfselektroden, entweder flächenförmig oder entsprechend 3b und 3c.

Sowohl die ringförmigen als auch die kreis- und spiralförmigen Ultramikroelektroden können in Analogie zur Fig. 2g mit punktförmigen Ultramikroelektroden zusätzlich strukturiert sein und weisen dann auch analoge Eigenschaften auf.

Eine besondere Ausführungsform der Ultramikroelektrodenarrays entsteht nach Anspruch 7 dadurch, daß auf den einzelnen Positionen bandförmige Elektroden, wie in Fig. 2a, 2b, 2c, 2d oder 2i, oder flächenförmige Elektroden analog Fig. 2e, mehrfach übereinander gestapelt werden und die dann von isolierenden Zwischenschichten wie Siliziumdioxid, Siliziumnitrit, Siliziumoxinitrit voneinander isoliert sind. Dazu wird das Aufdampfen von Metallen und die PECVD-Abscheidung der Isolatorschichten kombiniert. Diese gestapelten Elektroden sind typischerweise 10–200 nm dick und bewirken an den Schnittkanten eines solchen Stapels, der von einem Isolationsmaterial bedeckt ist, ein Ultramikroelektrodenverhalten, wo allerhöchste Annäherung der Elektroden und die Erzeugung ultrahoher Feldstärken erreicht werden. Die einzelnen Schichten werden bei dieser Anordnung unter einer isolierenden Bedeckung seitlich zu Kontaktflächen einzeln und individuell herausgeführt.

Prinzipiell ist es auch möglich, die in Fig. 2 gezeigten und vorstehend beschriebenen Ultramikroelektroden und Hilfselektrodenstrukturen mit metallischen Flächen zu kombinieren, die keinen elektrischen Anschluß tragen. Sie dienen dann z. B. als Arcale zur Immobilisierung von affinitätsbindenden Molekülen.

Die Ultramikroelektroden einer einzelnen Arrayposition werden mit metallischen Gesamtflächen von typischerweise 100–30 000 µm² ausgeführt und gestatten es daher, Arraypositionen mit sehr kleinen Abmessungen zu konstruieren, wobei die Abstände der Arraypositionen typischerweise den Abmessungen der aktiven Elektrodenflächen von 30 µm bis 300 µm entsprechen, aber auch wesentlich größer oder kleiner sein können, wenn Applikationen dies erfordern.

Wie in Fig. 1d dargestellt, werden für spezielle Anwendungen, dies sind insbesondere quantitative voltametrische

Meßverfahren wie das Redox-Recycling, die Arraypositionen durch volumensparierende Mikrokompartments voneinander abgetrennt. Im Falle qualitativer Detektion, wie lokale Impedanzspektroskopie an sensorgebundenen Fängermolekülen ist die Volumenseparierung in der Regel nicht erforderlich.

Volumenkompartimentierte Mikroareale werden auch dann benutzt, wenn Reaktionen und Molekülimmobilisierungen auf individuellen Arraypositionen ausgeführt werden sollen. Falls die Detektion dies erfordert, können diese Kompartments wahlweise nach ausgeführten Immobilisierungsreaktionen wieder entfernt werden. Damit entsteht ein ideal planares Sensorarray, das homogen sowohl für Analytals auch Reagenzlösungen zugänglich ist.

Mittels Stempel-, Piezo- oder Tintenstrahltechnik oder anderen Spottingverfahren, wie Mikrokapillardosierung können die zu immobilisierenden Moleküle ebenfalls auf den Sensorarrayflächen ohne Kompartimentierung lokal positioniert werden.

Die zu immobilisierenden Fängermoleküle selbst werden nach bekannten Verfahren über bifunktionelle Reagenzien z. B. Alkyloxisilane mit verschiedenen funktionellen Gruppen wie Halogen-, Amino-, Thioester- und Aldehydgruppen, Succinimid-, Carbodiimid- und andere gebräuchliche Kopplungsgruppen [H. G. Bäumert and H. Fasold, *Methods in Enzymology*, Vol. 172, p. 584] an die Oberflächen der planaren Trägerelemente wie z. B. Siliziumdioxid, Glas, Keramik oder Polymere oder auch an die Wandungen der Si- oder polymeren Mikrokompartments gebunden.

Eine bevorzugte Immobilisierungsform ist die Nutzung der Gold- und Platinoberfläche als Immobilisierungsareal für Thiolderivate von Fängermolekülen, die sog. selbstorganisierende molekulare Monolayer auf diesen gut definierten Elektrodenoberflächen ausbilden [S. D. Evans et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 113 (1991) 5866].

In einer anderen Ausführungsform werden die im ganzen mit Self-assembling-Schichten auf den Elektroden belegten Arraypositionen teilweise wieder gereinigt. Moleküle, die sowohl auf Detektions- als auch Hilfsflächen gemeinsam auf den Metalloberflächen immobilisiert wurden, können durch Applikation elektrischer Felder gezielt von den Detektorelektroden wieder desorbiert werden. Durch elektrische Potentiale wird die Desorption von Thiolen erreicht, so daß die Detektionselektroden frei von Beschichtungen werden. Sie können dann Produkte detektieren, die z. B. auf anderen Flächen der Sensorarrayposition, wie den metallischen Hilfsflächen gebildet werden.

Alternativ zu den vorstehend beschriebenen Immobilisierungen von affinitätsbindenden Molekülen auf den Elektroden oder Hilfelektroden oder metallischen Hilfsflächen bzw. den Wandungen oder anorganischen Teilflächen der einzelnen Sensorareale können diese affinitätsbindenden Moleküle wahlweise auch über den Sensorpositionen angeordnet und dazu an partikulären oder gelartigen Trägern gebunden werden. In dieser Form ist es möglich, die Produkte der Enzymmarker von biochemischen Assays, die an kugelförmigen oder partikelförmigen Polymeren oder metallischen oder mineralischen Partikeln gebunden sind, in den o. g. Mikrokompartments anzuordnen oder mechanisch, beispielsweise durch Einschluß zu fixieren. Auch die Fixierung magnetischer Trägerpartikel in den Mikrokompartments durch Magnete unterhalb der Chips ist geeignet, unterschiedliche Sensorarraypositionen zu beladen.

Auch das Einbringen von Gelen mit inkorporierten affinitätsbindenden Molekülen oder Molekülkomplexen in den Mikrokompartments oder über die gesamte Sensorfläche ist möglich. Solche Gele können üblicherweise durch Diffusion oder elektrisch unterstützte Diffusion wie bei der Gel-

elektrophorese mit biochemischen Assays oder Assaykomponenten beladen werden. Durch die Anordnung mehrerer Ultramikroelektroden an jeder Arrayposition ist dies im Gegensatz zu anderen beschriebenen Verfahren an jeder einzelnen Sensorarrayposition unabhängig möglich.

In einer besonderen Ausführungsform werden die an der Arrayoberfläche immobilisierten Moleküle partiell in den Kompartments oder homogen über die gesamte Sensorarrayfläche mit einem diffusiblen Hydrogel bedeckt. Das Gel wirkt als Schutzschicht oder erleichtert den Molekültransport durch Elektrophorese.

Die Anordnung immobilisierter biochemischer Assays an Partikeln oder in Gelen über den Elektroden wird dadurch möglich, daß Detektionsverfahren wie das Redox-Recycling, die niedermolekularen von den Assays produzierten und an die Elektroden diffundierenden Enzymprodukte messen, solange die Wassereinlagerung in den Gelen oder Zwischenräumen zwischen Partikeln eine Diffusion gestatten. Das Redox-Recycling selbst ist durch die geringen Distanzen zwischen den Ultramikroelektroden dadurch ausgezeichnet, daß aufliegende Partikel oder Gele solche Detektionen nicht stören, da sie vorzugsweise in oder nahe der molekularen Doppelschicht, die durch Polarisation an den Elektrodenoberflächen entsteht, verlaufen. In gleicher Weise ist auch eine impedimetrische Detektion an den Ultramikroelektroden im Gegensatz zu üblichen Verfahren, die weit voneinander entfernte Elektroden nutzen [V. M. Mirsky et al. *Biosensors & Bioelectronics* 12,9-10 (1997) 977] weitgehend partikelunabhängig. Bei Ultramikroelektroden mit einem Elektrodenabstand von 200 nm und ca. 1 µm langen DNA-Molekülen, die an deren Oberfläche in größter Nähe zueinander affinitätsgebunden sind, verläuft das elektrische Feld zwischen 2 Bandlektroden im wesentlichen durch die Moleküle selbst, wobei weiter entfernte Partikel ebenso wie der Grundelektrolyt in der Lösung wenig Einfluß haben.

Ein besonderes Merkmal der Erfindung ist die individuelle Kontrolle elektrochemischer Prozesse zur Detektion an jeder einzelnen Arrayposition unabhängig in der Weise, daß durch elektrisches Auslesen und damit verbundenes Schalten diese Prozesse nicht gestört werden. Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß die Elektrodenpolarisation wie sie beispielsweise für das voltametrische Redox-Recycling benötigt wird, an allen Arraypositionen individuell erzeugt werden muß. Dies ist problemlos durch Multipotentialstadien mit direkten Leiterbahnen zu jeder Chiparrayposition und jeder Einzelelektrode simultan und parallel möglich [R. Hintsche et al. *Biosensors & Bioelectronics* 9 (1994) 697]. Da auf diese Weise die Zahl der möglichen Arraypositionen sehr durch den elektronischen Aufwand beim Meßgerät begrenzt ist und auch durch die Zahl der Leiterbahnen limitiert ist, werden erfindungsgemäß die einzelnen Detektorelektroden seriell, d. h. nacheinander vermessen. Vorbedingung ist dabei, daß die elektrischen Potentiale zur Polarisation für Anode und Kathode beim Redox-Recycling auch dann erhalten bleibt, wenn die Elektroden einzeln nacheinander oder in Gruppen mittels individueller Schalter an das Meßgerät angeschlossen werden.

In der einfachsten Ausführungsform mit direkter Kontaktierung der Elektrodenarraypositionen nach Fig. 1 wird dazu ein ASIC benutzt. Bezüglich der Messung hat er die Funktionalität eines Multiplexers, d. h. die individuell mit dem ASIC verbundenen Sensorpositionen werden seriell adressiert und auf einen einzigen Bipotentialstadien zur Auslesung geschaltet. Abweichend von einer einfachen Ausführung sind jedoch die einzelnen Schalter des Multiplexers nicht als Ein-Aus-Schalter sondern als Umschalter ausgelegt. Im nicht adressierten Zustand verbinden sie die Sensorpositionen mit einer Biasspannung, die der Aufrechterhaltung der

Elektrodenpolarisation während des Nichtlesezustands dient.

In einer komplexeren Ausführungsvariante wird die störungsfreie Umschaltung eines größeren Arrays von Sensorelektroden erfindungsgemäß, wie in Fig. 3 dargestellt, dadurch erreicht, daß neben üblichen Adress- und Meßleitungen, wie sie für elektronische Speicher seit langem verwendet werden, zusätzliche potentialführende Leitungen, sogenannte Biasleitungen angeordnet werden. Die Adressierung wird dabei von einem Adressierelement, das außerhalb des eigentlichen elektrischen Sensorarrays entsprechend Detail 10 in Fig. 3 angeordnet sein kann, über die Adressleitungen 14/15 und 16/17 ausgeführt werden. Die Meßleitungen 18 und 19 in Fig. 3 und die Biasleitungen 20 und 21 werden dabei von speziellen Leseverstärkern 11 ausgelesen, die ebenfalls außerhalb des eigentlichen elektrischen Sensorarrays angeordnet sind. Durch die Meßleitungen 18 werden dabei alle Elektroden 3 auf den unterschiedlichen Sensorarraypositionen erfaßt und gemessen, während die Meßleitung 19 alle Interdigitalelektroden 3' in Fig. 3 messen kann. In analoger Weise können alle Elektroden 3 von der Biasleitung 21 mit der gleichen Polarisationsspannung, die z. B. für die Oxidation einer zu detektierenden Molekularart erforderlich ist, versorgt werden. In gleicher Weise können alle Elektroden 3' durch die Biasleitung 20 mit dem Potential für die Elektrodenpolarisierung, das für eine Reduktion notwendig ist, versorgt werden. Die an jeder Sensorposition integrierten Umschalteneinrichtungen 12 und 13 bewirken dabei die Umschaltung zwischen Lese- und Nichtlesezustand. Beim Lesezustand wird die ablaufende elektrochemische Reaktion meßtechnisch über die Meßleitungen erfaßt und gleichzeitig mittels des Multipotentialostaten gesteuert. Im Nichtlesezustand werden die elektrochemischen Vorgänge, z. B. Oxidation oder Reduktion, durch die Biasleitungen 21 für 3 und 20 für 3' kontinuierlich mit den Polarisationsspannungen versorgt und kontrolliert. Die Schaltelemente 12 und 13 werden z. B. mit konventioneller CMOS-Technologie mit üblicher Halbleitertechnologie in Siliziumwafern an jeder Arrayposition lokal angeordnet. Über diesen integrierten CMOS-Schaltern, an die Meß-, Bias- und Adressleitungen geführt werden, befindet sich eine flüssigkeitsresistente Isolationsschicht, z. B. aus Siliziumoxinitrit, wahlweise in Kombination mit Siliziumdioxid. Der Kontakt zwischen den Schaltelementen 12 und 13 und den individuellen Elektroden 3 und 3', die in der beschriebenen Dünnschichttechnologie auf dieser Isolationsschicht durch Elektronenstrahlverdampfen oder Sputtern und ähnliche Prozesse aufgebracht werden, wird durch eine senkrechte Durchkontaktierung zur CMOS-Elementebene im Silizium erzeugt. Alle Strukturen oberhalb dieser flüssigkeitsresistenten Isolationsschicht entsprechen den in Fig. 1 und 2 dargestellten Details mit dem Unterschied, daß die in Fig. 1 gezeigte direkte Kontaktierung durch Leiterbahnen entfällt. Die besondere Konstruktion der integrierten CMOS-Schalteneinrichtungen 12 und 13 ermöglicht es, das Umschalten vom Lese- in den Nichtleseprozeß für die interdigitalen Ultramikroelektroden ohne Einfluß zu realisieren. Dies ist notwendige Voraussetzung für den gesamten meßtechnischen Prozeß, da sich durch die Elektrodenpolarisation an der Elektrodenoberfläche eine elektrochemische Doppelschicht ausbildet, die als eine Art chemisches Gedächtnis während des Schaltprozesses erhalten bleiben muß.

Der Umschaltprozeß dauert nur Mikrosekunden, so daß während dieser Zeit die Elektrodenkapazitäten als Spannungsspeicher wirken. Danach ist die Versorgung der Elektroden mit Polarisationsspannung von den Meßleitungen 18 und 19 auf die Biasleitungen 20 und 21 umgeschaltet.

In Fig. 3 stellen die schwarzen Vollkreise 12 diejenigen

Schaltelemente dar, die im Lesezustand von den Meßleitungen 18 und 19 mit der Polarisationsspannung versorgt werden und durch diese Leitungen auch mit den Leseverstärkern zur Detektion des elektrochemischen voltametrischen oder impedimetrischen Ereignisses verbunden sind. Die Adressierung vom elektronischen Element 10 erfolgt dabei reihenweise, so daß sich, wie schematisch dargestellt, mehrere Sensorarraypositionen im Lesezustand befinden. Sie können durch das meßtechnische Element mit Leseverstärkern 11 nacheinander, mit einem Leseverstärker oder parallel mit zwei Leseverstärkern ausgelesen werden bzw. der elektrochemische Vorgang verfolgt werden. Die reihenweise Adressierung durch die Adressleitungen 14 und 15 erlaubt eine beliebige Verlängerung dieser Reihe adressierter Arraypositionen und beliebig viele Elemente, die jeweils wieder durch die Meßleitungen nacheinander oder parallel durch Leseverstärker ausgemessen werden können. Nach Beendigung des Meßereignisses an dieser senkrechten mit schwarzen Schaltelementen dargestellten Reihe von Sensorarraypositionen kann die benachbarte senkrechte Reihe mit den bisher inaktiven Schaltelementen 13 durch die beiden Adressleitungen 16 und 17, die jeweils die Elektroden 3 oder 3' ansteuern, in die Meßposition wie vorstehend beschrieben umgeschaltet werden. Dies geschieht, nachdem die vorher in Lesezustand befindliche Reihe auf den Nichtlesezustand umgeschaltet wurde. So fortschreitend kann einzeln oder in Reihen jede Sensorarrayposition wie in der Speichertechnik üblich, adressiert und ausgelesen werden. Diese Meß-, Bias- und Adressleitungen können in der Siliziumebene durch eine sog. Mehrlagenverdrahtung realisiert werden, wie sie in der Siliziumtechnologie für elektronische Bauelemente üblich ist.

In einer anderen spezifischen Ausführungsform, die in Fig. 4 schematisch dargestellt ist, werden die elektrischen Sensorarrays zusätzlich neben den CMOS-Schalteneinrichtungen 12 und 13 zusätzlich mit weiteren integrierten Elementen zur Auslesung, Verstärkung und gegebenenfalls zur Zwischenspeicherung ausgerüstet. Dabei wird der Lesezustand, wie vorstehend zu Fig. 3 beschrieben, in gleicher Weise durch die Adressierungsleitungen 14 und 15 bestimmt und die übrigen Arraypositionen mit den Adressleitungen 16 und 17 über die Biasleitungen 20 und 21 kontrolliert und durch die Meßleitungen 18 und 19 ausgelesen. In den elektronischen Elementen 22 und 23 in Fig. 4 sind an jeder Arrayposition und an jeder individuellen Elektrode 3 und 3' elektronische Verstärker angeordnet. Dabei wird an der Arrayposition direkt das elektrochemische Meßsignal, was durch die Elektrodenprozesse generiert wird, über Vorverstärker verstärkt und kann dann entsprechend Fig. 3 über die Meßleitungen 18 und 19 im adressierten Zustand ausgelesen werden. Bei dieser Verfahrensweise sind die nichtadressierten Leseverstärker in den elektronischen Elementen 23 ohne Funktion.

In einer besonderen Ausführungsform werden in die elektronischen Elemente 22 und 23 zusätzlich elektronische Speicher integriert. Da der elektrochemische Prozeß durch die konstant erhaltene Elektrodenpolarisation auch in den Zeiten abläuft, in denen sich Elektrodenarraypositionen im Nichtlesezustand befinden, wird diese Zeit genutzt, um über die Leseverstärker das in den Ultramikroelektroden generierte Signal in einem elektronischen Zwischenspeicher zu akkumulieren und abzuspeichern. Bei dieser Ausführungsform wird das an den Elektroden generierte Signal über Leseverstärker in einen Zwischenspeicher gegeben, der beim Lesevorgang über die Meßleitungen ausgelesen wird. Danach wird beim Lesevorgang das während der gesamten Zeit im Nichtlesezustand im Speicher akkumulierte elektrochemische Ergebnis sehr rasch ausgelesen. Es ist bei dieser Anordnung nicht notwendig, längere Meßzeiten während eines

Auslesevorganges in Kauf zu nehmen. Die besondere Konstruktion mit den zusätzlichen Biasleitungen macht diese Art der Meßwertgewinnung und Zwischenspeicherung möglich. Man erreicht auf diese Weise eine erhebliche Beschleunigung des Ausleseprozesses und eine wesentliche Verbesserung des Nutzsignals verglichen mit der Ausführungsvariante in Fig. 3. In der Ausführungsvariante gemäß Fig. 4 lassen sich durch die Integration elektronischer Komponenten an den einzelnen Arraypositionen auch elektrische Sensorarrays mit höherer Dichte der Arraypositionen (1000 und mehr) anordnen.

Typisch für die integrierten CMOS-Schalter und elektronischen Zusatzelemente unterhalb der Arraypositionen im Silizium werden Standardtransistoren wie in Fig. 5 schematisch gezeigt als CMOS-Wanne 24 mit Source 25 und Drain 26 angeordnet. Gates und Leiterbahnen aus Polysilizium 31 verbinden wie auch CMOS-Aluminium 27 im CMOS-Dielektrikum 28 die chipinternen Elemente. Ebenfalls mittels Aluminium oder auch Wolfram wird die Kontaktierung der chip-internen Elemente mit den Elektroden an den Sensorarraypositionen durch eine flüssigkeitsdichte Siliziumnitrid-Passivierung 29 hindurch erreicht. Der Kreuzungsreich 32 zeigt exemplarisch, wie sich Leiterbahnen kreuzen, z. B. die Adressleitung 15 mit Meßleitung 18 gemäß Fig. 4.

Die vorstehend beschriebenen mit verschiedenen elektronischen Elementen ausgerüsteten elektrischen Sensorarrays eignen sich alle in gleicher Weise für eine Multianalytmesung. Wie vorstehend beschrieben, wird die Immobilisierung unterschiedlicher affinitätsbindender Moleküle auf einzelnen Sensorarraypositionen, z. B. in den Mikrokompartments, ausgeführt, indem durch Mikrodosierung beispielsweise tintenstrahlanaloge Dosiertechnik (z. B. Piezodosierer) oder Mikrokapillardosierung die Reaktionslösungen zugeführt werden. Es ist ebenso möglich, durch Stempeltechniken individuell auf einzelne Positionen Moleküle aufzubringen, die dann reagieren oder haften. Beispielsweise werden Selfassembling-Schichten durch sog. Kontaktstempelung vom Stempel auf die Elektrodenoberfläche übertragen und damit individuell über eine Thiol-Goldbindung belegt.

Bei einer anderen Ausführungsform wird die Immobilisierung durch aufgesetzte Mikrodurchflußsysteme bzw. Stempel für die Applizierung von Flüssigkeiten durch Ein- und Ausflußöffnungen über einzelnen Arraypositionen oder in Gruppen oder in Reihen erreicht. Die so mit unterschiedlichen affinitätsbindenden Molekülen ausgestatteten Arraypositionen aller Ausführungsformen werden dann mit einem Multianalytgemisch in ihrer Gesamtheit in Kontakt gebracht. Dies kann durch Tauchen des Sensorarrays in die Analytlösung oder durch Einbau in eine Durchflußzelle oder durch Befüllen von Kompartments an den Einzelpositionen erfolgen. Die unterschiedlichen affinitätsbindenden Moleküle auf oder über den Arraypositionen binden durch ihre hohe Spezifität ausschließlich ihr Zielmolekül, sofern es im Analytgemisch vorhanden ist. Dieser Bindungsprozeß ebenso wie ein analoger Bindungsprozeß an immobilisierten Molekülen in Gelen oder auf Partikeln ist Voraussetzung für den folgenden elektrochemischen Detektionsprozeß. Die Verwendung von trägergebundenen Fängermolekülen erzielt hohe Beladungsdichten in einer Sensorarrayposition, da nicht nur die Flächen, sondern das Volumen genutzt werden.

Für das Redox-Recycling werden Enzymmarker verwendet, die entweder mit dem Zielmolekül an die Sensorarrayposition eingeführt werden oder nach der erfolgten spezifischen Bindung durch sekundäre Bindungsprozesse wie Antikörperbindung, Interkalation, kovalente Anheftung und andere gebräuchliche Markierungsreaktionen gebunden werden. Die Markerenzyme, die sich nur an Arraypositionen

befinden, an denen die molekulare Erkennungsreaktion stattgefunden hat, werden mit einem elektrochemisch inaktiven Substrat z. B. p-Aminophenylphosphat versetzt, das dann durch die Enzymreaktion in ein elektrodenaktives Produkt das p-Aminophenol umgewandelt wird. Im zyklischen Prozess einer an Anode und Kathode der bandförmigen Ultramikroelektroden ablaufenden Oxidation und Reduktion wird ein Summenstrom ermittelt, der mit der Menge der an dieser Arrayposition gebundenen Moleküle streng korreliert. Bezogen auf gebundene Analytmoleküle muß die Menge eingeführten Markerenzyme quantitativ und stöchiometrisch sein. Nutzt man die zur Immobilisierung hergestellten Mikrokompartments auch zur Volumentrennung bei dieser Art Detektion aus, ist die in jedem Mikrokompartiment entstehende Konzentration an elektroaktiven Spezies ein quantitatives Maß für die Zahl der an dieser Arrayposition individuell stattgefundenen Erkennungsreaktionen. Auf diese Weise bedeutet das Fehlen einer elektrochemischen Reaktion auch das Ausbleiben des Erkennungsereignisses und damit die Abwesenheit des gesuchten Analyten an der jeweiligen Arrayposition.

Die von den Enzymmarkern für das Redox-Recycling erzeugten elektrodenaktiven Moleküle können problemlos in wasserhaltigen Gelen an die Elektrodenoberfläche diffundieren. Auch aus einer Partikelpackung über dem Elektrodenarray diffundieren sie über die Flüssigkeit zwischen den festen Partikeln, wobei im geringen Restvolumen besonders rasch eine Konzentrationserhöhung herbeigeführt wird.

Da sich der Detektionsprozeß durch das Ultramikroelektrodenverhalten nur unmittelbar an der Elektrodenoberfläche abspielt, ist die bestimmende Zone die Elektrodendoppelschicht und wenige Moleküllagen darüber. Dadurch ist die Methode unabhängig von Konvektion und allein durch die Braun'sche Molekularbewegung bestimmt, so daß jegliches aktives Rühren unterbleiben kann und zum Beispiel mit Stop-Flow-Verfahren oder geschlossenen Kammern und Mikrokompartments gearbeitet werden kann.

In einer anderen Ausführungsform, wenn die Mikrokompartments nach erfolgter Immobilisierung wieder entfernt wurden, erhält man nur qualitative Aussagen für die An- oder Abwesenheit von Analyten unter der Bedingung, daß die Konvektion sich bildender Markerenzymprodukte genügend unterdrückt wird, z. B. durch ausreichenden Abstand der Positionen und stopped flow Analytik.

In einer weiteren Ausführungsform werden die planaren Sensorarrays zur Redox-Recycling-Detektion wieder mit volumentrennenden Elementen für die Arraypositionen versehen. Dies kann beispielsweise auch durch das Aufsetzen der vorstehend zur Immobilisierung beschriebenen Stempel erfolgen. Es lassen sich damit Einzelsensorarraypositionen, Gruppen von Arraypositionen oder Reihen von Arraypositionen separat erfassen und messen.

Bei einer anderen Ausführungsform, die die elektrochemische Impedanzspektroskopie als Detektionsmethode verwendet, werden ebenfalls die in Fig. 1, 3 und 4 beschriebenen Anordnungen der elektronischen Schalt- und Zusatzelemente Wechselstrom verwendet. Die Spezifität dieser Meßmethode und der Abstand der Elektroden in den nan-Dimensionen machen es möglich, eine solche Reaktion markerfrei zu vermessen.

Zur Messung werden Wechselströme mit bestimmter Frequenz oder Frequenzgemische von 0,1 Hz–1 MHz auf eine Biasspannung von vorzugsweise 10–200 mV aufgeprägt, die in der gleichen Weise wie die Elektrodenpolarisation für die voltametrischen Methoden an die Arraypositionen angelegt wird. Bei dieser Detektionsmethode werden Elektrodenabstände < 500 nm, bevorzugt 20–200 nm, verwendet. Wie bei den Ausführungsvarianten für das Redox-Recycling

werden die auf oder zwischen den Elektrodenoberflächen in der Sensorarrayposition immobilisierten, affinitätsbindenden Moleküle mit dem Gemisch verschiedener Analyte zusammengebracht und die molekulare Erkennungsreaktion läuft wie voranstehend beschrieben ab. Mit den durch die geringen Elektrodenabständen erzielbaren starken elektrischen Feldern von einigen MV/m kann auf jeder Position individuell vermessen werden, wie die affinitätsbindenden Moleküle die Elektrodenoberfläche bedecken. Dies zeigt sich entsprechend der Bedeckung der Oberflächen durch die Abnahme der Kapazität der Ultramikroelektroden. Erfolg der Immobilisierung und Bedeckungsgrad lassen sich auf diese Weise quantitativ verfolgen. Die mit affinitätsbindenden Fängerelektroden versehenen einzelnen Sensorarraypositionen werden individuell mittels Impedanzspektroskopie vermessen, wobei Kapazität, Leitfähigkeit und Dielektrizitätskonstante sowie der Phasenwinkel durch die Messung und ihrer Auswertung separiert werden können. Nach erfolgter Erkennungsreaktion an einer einzelnen Arrayposition, die üblicherweise mit einem größeren Biomakromolekül erfolgt, bildet sich ein großer Molekülkomplex, der typischerweise größer ist als der Abstand zwischen zwei Elektroden. Das elektrische Feld reicht dabei nicht erheblich über diese Molekülkomplexe hinaus und erfährt so nur die elektrodennahen Bereiche, so daß schwebende Partikel nicht stören. Eine neue Impedanzmessung nach erfolgten Erkennungsreaktionen mit den gleichen Parametern wird zur Differenzbildung benutzt. Eine sichtbare Veränderung gibt Auskunft darüber, an welchen Positionen Komplexbindungen stattgefunden haben. Die Impedanzänderung wird durch die Verdrängung des Elektrolyten und Beeinflussung des elektrischen Feldes z. B. durch geladene DNA-Moleküle hervorgerufen.

Im Unterschied zum quantitativen Redox-Recycling ist die impedanzspektroskopische Detektionsmethode semi-quantitativ und gestattet eine Aussage über stattgefundene oder nicht stattgefundene molekulare Erkennungsreaktionen. Die Parameter, die bei der Impedanzspektroskopie ausgewertet werden, erlauben Aussagen über die Größe der Moleküle, die an der Elektrodenoberfläche bei der Erkennungsreaktion gebunden haben sowie über den Ladungszustand dieses Moleküle. Auch die Dichte der Molekülbelegung hat Einfluß auf das Meßergebnis. Alle Parameter können zur näheren Analyse des molekularen Erkennungsvorgangs und der beteiligten Partner herangezogen werden.

In einer speziellen Ausführungsform wird das elektrische Sensorarray nach Immobilisierung der affinitätsbindenden Moleküle oder nach stattgefundener molekularer Erkennungsreaktion und entsprechender Waschvorgänge mit einem Hydrogel belegt. Diese Belegung mit Hydrogel kann für verschiedene Verfahren zur Anwendung der elektrischen Sensorarrays vorteilhaft sein. Bei der Bedeckung der oberflächengebundenen affinitätsbindenden Moleküle mit Hydrogel können z. B. die Analyte aktiv durch Dosierung oder elektrophoretisch durch Applikation elektrischer Felder mittels Hilfelektroden in das Gel und an die Affinitätspartner herangebracht oder durch Diffusionsprozesse zugeführt werden. Die Beschichtung mit Hydrogelen nach stattgefundener molekularer Erkennungsreaktion an den Oberflächen kann auch dazu verwendet werden, zusätzliche Marker oder Reagenzien durch elektrophoretische Prozesse oder Direkt-dosierung an die Molekülkomplexe heranzuführen und zu detektieren.

Alternativ werden Hydrogele benutzt, um partikelgebundene immobilisierte Fängermoleküle oder nach stattgefundener molekularer Erkennungsreaktion immobilisierte Ziel-analyte in den Mikrokompartmenten einzuschließen. Die Methode ist bevorzugt geeignet für die Anwendung des Redox-

Recycling, da die diffundierenden Enzymprodukte durch das Gel wenig gehindert werden, an die Elektrodenoberfläche zu gelangen. Zu beobachten ist dabei lediglich eine Verlangsamung der Diffusion.

In einer anderen Ausführungsform werden die Hydrogele über das gesamte elektrische Sensorarray gleichmäßig aufgebracht und bewirken durch ihre Diffusionshemmung eine verbesserte Zuordnung der Bindungsvorgänge zu einzelnen Arraypositionen, ohne daß Mikrokompartmente hergestellt wurden.

Die an den einzelnen Arraypositionen angeordneten Ultramikrodetektionselektroden und flächenförmigen oder mit Punktelektroden besetzten Hilfelektroden sowie die spiral- oder kreisförmig angeordneten Bandlektroden nach Fig. 2 können neben ihrer Verwendung für die Detektionsprozesse selbst auch zur Applikation elektrischer Felder im Sinne einer Freifeld- oder Gelelektrophorese eingesetzt werden. Für die Heranführung geladener Analytmoleküle oder Reagenzien an die Elektrodenoberflächen, z. B. an den Ort der molekularen Erkennungsreaktionen, können besonders vorteilhaft parallel angeordnete interdigitale Ultramikroelektroden nach Fig. 2b, 2c, 2d oder 2g verwendet werden. Dabei werden in einer Ausführungsform des Verfahrens die beiden Ultramikroelektrodenpaare in Fig. 2b, 2c und 2d beispielsweise in der Weise zu einem elektrophoretischen System geschaltet, daß immer zwei zusammengehörige interdigitale Fingerpaare oder Paare von bandförmigen Ultramikroelektroden einen Pol des elektrischen Feldes bilden. Je nach Polarisierung und Ladung der Moleküle werden elektrophoretische Transportvorgänge eingeleitet. Verwendet man Felder mit niedriger Frequenz im unteren Hz- und mHz-Bereich, werden wechselseitig Moleküle an die Elektroden herangeführt. Üblicherweise werden die elektrischen Felder in Sequenzen mit erzeugt. In den stromlosen Pausen können durch Elektrolyse gebildete Gase abdiffundieren und auch pH-Gradienten sich ausgleichen.

In einer anderen Ausführungsform werden die Hilfelektroden wie in Fig. 2e und 2f zur Applikation der vorstehend beschriebenen elektrischen Felder benutzt. Sie können dabei die gleiche Polarisierung aufweisen und gegen einen interdigitales Elektrodenpaar 3, 3' geschaltet werden, oder es wird das Feld zwischen den Hilfelektroden 3e und 3e' bzw. 3f und 3f' erzeugt, so daß die Moleküle in die Nähe der Detektionselektroden 3, 3' gezogen werden. Im Gegensatz zu den flächenhaften Hilfelektroden 3e und 3e' erlauben die Hilfelektroden 3f und 3f' durch die punktförmigen aktiven Elektrodenflächen mit Ultramikroelektrodencharakter eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche durch die verbesserte Diffusion. Auch durch die Elektrodenkonstruktion 3g und 3g' kann eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche als für 3 und 3' erreicht werden. Im Ergebnis dieser punktförmigen Strukturierung gibt sich durch hemisphärische Diffusion der Vorteil, daß eine wesentlich höhere Stromdichte pro Fläche erreicht werden kann, trotzdem die aktive Elektrodenfläche verkleinert ist.

Diese Ausführungsform zur Heranführung von Analyt oder Reagenzmolekülen an die Elektrodenoberfläche wird ergänzt durch die gleichzeitige Verwendung der Detektions- und Hilfelektroden zur Erzeugung elektrischer Felder nach stattgefundener Erkennungsreaktion. Bei dieser Verfahrensweise werden die schon bei niedriger Spannung unter 1 V entstehenden erheblichen Feldstärken zwischen den Elektroden dazu genutzt, daß schwach gebundene Moleküle von ihrem Affinitätspartner im Unterschied zu stärker gebundenen Molekülen von den Detektionselektroden wieder entfernt werden können. Schon das einfache Ultramikroelektrodeninterdigitalpaar in 3, 3' in Fig. 2c gestattet die Beseitigung schwächer und damit falsch gebundener Molekülkom-

plexe. Dazu wird das applizierte Feld zwischen Elektrode 3 und 3' als Wechselfeld mit niedriger Frequenz (wenige Hz oder mHz) benutzt, von beiden Elektroden unerwünschte Spezies zu entfernen. Das Wechselfeld mit niedriger Frequenz bewirkt dabei, daß immer die Elektrode, die gleich zur Ladung des unerwünschten Moleküls geladen ist, durch ihr hohes Feld die Abstoßung dieses Moleküls bewirkt. Durch die Wechselfelder werden beide Elektroden nacheinander in diesen abstoßenden Zustand versetzt und die Reaktion findet im Summenergebnis auf beiden Interdigitalsystemen statt. Die Feldapplikation wird nach kurzer Zeit, d. h. wenige zehntel bis Sekunden durch Pausen unterbrochen, in denen Gase und pH-verändernde Spezies abdiffundieren können. Die Reaktion kann durch biochemische Waschvorgänge oder durch Temperaturveränderung unterstützt werden. Eine Temperaturkontrolle kann sowohl extern als mit auf den Chips aufgebrachte Heizer aus Dünnschichtmetallbändern wie Platin realisiert werden.

Mit multiplen Ultramikroelektrodenanordnungen, wie in 2b, 2d, 2e, 2f und 2i, ist die Anwendung des Prozesses, wie für 2a beschrieben, für jedes Paar interdigitaler oder bandförmiger Ultramikroelektroden möglich. Prinzipiell kann dieser Prozeß durch Kombination beliebiger Detektor- und/oder Hilfelektroden mit dem gleichen Verfahren der niedrigfrequenten Feldimpulspolung und der Beseitigung schwachbindender bzw. unerwünschter Moleküle von den Elektrodenoberflächen benutzt werden.

Als besondere Ausführung werden die in Fig. 2b, 2e, 2f und 2i außen liegenden Elektroden zur Felderzeugung verwendet, während die dazwischen liegenden Elektroden stromlos sind. Diese Art der Applikation kann auch zur Heranführung von Molekülen an die zwischenliegenden Elektrodenpaare benutzt werden, da sich diese in einer Art Feldkäfig befinden. Mit den gleichen multiplen Anordnungen sind überdies auch kombinierte Gleich- und Wechselstromapplikationen, Umpolungen sowie wahlweise Adressierung der Einzelelektroden möglich und damit gezielte Effekte der Molekülheranführung und der Molekülbeseitigung an beliebigen Elektroden zu erzielen.

In den Ausführungsformen gemäß Fig. 2e und 2f lassen sich die flächenförmigen oder mit Punkten besetzten Hilfelektroden so einsetzen, daß jeweils zu einer oder beiden Ultramikroelektroden die gewünschte Polung der Elektroden zur Beseitigung von Molekülen vorliegt. Hier ist die Gleichstrom oder die niedrigfrequente Wechselstromapplikation über Kreuz, z. B. in Fig. 2e zwischen 3e und 3', bzw. zwischen 3e' und 3 möglich. Damit lassen sich die Einzelelektroden selektiv behandeln. Die unterschiedliche Behandlung der Elektrodensysteme in 2b, 2d, 2e und 2f läßt sich in einer anderen Ausführung auch dazu verwenden, daß an einzelnen Elektroden unerwünschte Bindungen beseitigt werden und an anderen bestehen bleiben, so daß aus der Differenzmessung auf die Differenzmenge geschlossen werden kann.

An den kreisförmigen Elektroden gemäß Fig. 2b oder spiralförmigen analogen Strukturen sind die vorstehend beschriebenen Verfahren zur Verwendung der elektrischen Felder dadurch besonders geeignet, daß durch eine zentrale Elektrode eine Art Feldkäfig über die dazwischen liegenden Elektroden gelegt werden kann, so daß diese auch im stromlosen Zustand von diesem Feld in gewünschter Weise zur Entfernung oder Heranführung von Molekülen genutzt werden können.

Die punktförmigen Ultramikroelektrodenanordnungen in Fig. 2h können in einer anderen Ausführungsform vorteilhaft zur Erzeugung elektrischer Felder sowohl zur Anreicherung von Molekülen als auch zur Entfernung von Molekülen eingesetzt werden. Dazu werden diese Elektroden an verschiedenen Stellen eines Sensorarrays z. B. als außen lie-

gender Ring oder konzentriert in Innenposition oder durch Kombination von beiden ausgewählten Positionen eines Sensorarrays angeordnet. Sie dienen zur Erzeugung starker Felder an anderen Arraypositionen über den Raum des Sensorarrays hinweg durch besonders hohe Stromdichten. Die erzielbare hohe Stromdichte bei vergleichsweise niedrigen Spannungen erzeugt Feldkäfige, die den Transport von geladenen Molekülen nach elektrophoretischen Prinzipien besonders verbessern.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit direkter Kontaktableitung in Siliziumtechnologie

Mikroelektrodenstrukturen entsprechend Fig. 1 und 2a werden in Standardsilizium-technologie hergestellt. [K. Reimer et al. Sensors and actuators, A 46/47 (1995) 66]. Dazu wird 500 nm dickes thermisches Oxid auf 4"-Siliziumwafern erzeugt. Auf dem Oxid wird Fotolack photolithografisch so strukturiert, daß die Konturen der Elektroden für die Elektrodenstrukturen freiliegen. Das Ultramikroelektrodensystem konzentrischer Ringe gemäß Details in Fig. 2a besteht aus ringförmigen Elektrodenbändern mit 1,5 µm Breite im Ringabstand von 800 nm. Die Ringe sind abwechselnd über die Leiterbahnen 6 mit den Kontakten gemäß Fig. 2a verbunden. Es sind 16 Sensorarraypositionen in einer 4 × 4 Matrix mit Arraypositionen von 300 µm Durchmesser auf dem Sensorarray angeordnet. Die 2 × 16 Ableitkontakte befinden sich auf zwei benachbarten Seiten des 1 × 1 cm großen Siliziumchips. Die Abstände der Sensorarraypositionen betragen 400 µm, so daß ein aktives Sensorarraygebiet von ca. 2,5 mm × 2,5 mm entsteht.

Durch 15 sec Tauchen in 10%ige Flußsäure wird das Oxid ca. 150 µm tief angeätzt. Eine 20 nm dicke Titanhaftsicht und eine 150 nm dicke Goldschicht werden auf die gesamte Oberfläche mittels Elektronenstrahl aufgedampft. Durch einen Lift off-Prozeß wird alles Material zwischen den Elektroden, Leiterbahnen und Kontakten beseitigt. Der Wafer wird anschließend mit einer 400 nm dicken Silizium-Oxinitridschicht bedeckt, die im Plasma durch chemische Abscheidung (PECVD-SiN_xH) erzeugt wird. Im folgenden werden die Arraypositionen und den außenliegenden Kontaktflächen durch reaktives chemisches Trockenätzen bis auf die Goldflächen freigelegt. Nach Aufschleudern eines Schutzlackes wird der Wafer von der Rückseite entsprechend der vorgesehenen Einzelchipkanten ca. 250 µm tief von der Rückseite eingesägt.

Beispiel 2

Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit direkter Kontaktierung auf Glas

Auf 4"-Pyrexglaswafern werden mit einer dem Beispiel 1 entsprechenden Photolithographie Interdigitalelektrodenarrays entsprechend Fig. 2e mit 9 Sensorpositionen im Raster 3 × 3 strukturiert. Dazu wird abweichend von Beispiel 1 auf das Glas eine 20 nm dicke Chromhaftsicht gefolgt von einer 150 nm dicken Platinschicht aufgedampft und wie im Ausführungsbeispiel 1 durch Liftoff-Technik fertig strukturiert. Als Haftvermittler für die folgende Isolationsschicht wird eine 3%ige Lösung von Alkylloxysilan in Aceton mit der Oberfläche in Kontakt gebracht. Die 400 µm großen Sensorarraypositionen im Abstand von 500 µm werden nach Aufschleudern einer 10 µm dicken Polyimidschicht mit

Standard-Photolithographie so strukturiert, daß die Kontaktflächen und die Sensorpositionen freigelegt werden. Das Interdigital-Elektroden-System mit Hilfselektroden entsprechend Fig. 2e besteht an jedem Elektrodenfingersystem aus 90 je 200 µm langen und 1 µm breiten Fingern, wobei die Interdigitalabstände 0,9 µm betragen. Die Hilfselektroden 3e und 3e' sind wie in der Fig. 2e dargestellt, bis 50 µm vom Rand der Sensorarrayposition flächig ausgeführt. Wie im Beispiel 1 wird der Wafer geschützt und eingesägt.

Beispiel 3

Herstellung eines elektrischen Sensorarray-Systems mit CMOS-Schaltern

Die Schalterebene wird mit einem CMOS-Standardprozeß [D. Widmann, H. Mader, H. Friedrich, Technologie hochintegrierter Schaltungen, Springer Berlin 1996] in einem Prozeß mit 1 µm Minimalstrukturen hergestellt. Die nach Fig. 3 erforderlichen Kreuzungen von Leiterbahnen werden durch Überkreuzungen von Polysilizium- und Aluminium-Bahnen realisiert. Der größere elektrische Widerstand spielt wegen der kleinen Sensorströme keine Rolle. Im verwendeten CMOS-Prozeß werden die Schalter 12 und 13 vorteilhaft als Transmission-Gates ausführen. Jeweils ein Transmission-Gate verbindet die Punkte 12a mit der Leitung 18 bzw. den Punkt 13a mit der Bias-Leitung 21. Die Adressleitungen bestehen aus einem parallel laufenden Paar von Leiterbahnen, an denen Signale komplementärer Polarität zu den Gates der beiden Transistoren eines Transmission-Gates geführt werden. Bei der einen Polung ist das Transmission-Gate 12a-18 leitend und das Transmission-Gate 13a-21 sperrend. Bei der umgekehrten Polung ist 12a-18 sperrend und 13a-21 leitend. Die Transmission-Gates schalten sowohl positive als auch negative Ströme. Zusätzlich zu den üblichen Anschlußpads einer CMOS-Schaltung an den Rändern des Chips enthält die Schaltung nach Fig. 3 an den Stellen 12a und 13a Aluminiumpads, mit denen die Verbindung zu den Elektroden-Arrays hergestellt wird. Standardmäßig wird der CMOS-Prozeß mit der Aufbringung einer PECVD-Nitridschicht und Öffnung der Anschluß-Pads in dieser passivierenden Schicht abgeschlossen. Auf diese Isolationsschicht werden mit gleicher Lift off-Technik, wie in Ausführungsbeispiel 1 dargestellt, Haftschrift und Gold-elektroden direkt aufgedampft und wie oben beschrieben photolithographisch strukturiert. Eine weitere Passivierung ist nicht vorgesehen, da die Kontakte von den Interdigital- und Hilfselektroden direkt senkrecht in die darunterliegende Schalterebene geführt werden.

Beispiel 4

Herstellung eines elektrischen Sensorarrays mit Schaltern, Verstärkern und Integrator in CMOS-Technologie

Für die Herstellung des Ausführungsbeispiels nach Fig. 4 wird der gleiche CMOS-Standard-Prozeß, sowie die gleiche Elektroden und Leitungsanordnung benutzt, wie unter Beispiel 3 beschrieben wurde. In der 1 µm-Technologie werden diese Bauteile auf einer Fläche von 300 µm × 400 µm angeordnet. Zwischen den Elektroden und den Transmission-Gates, die zu den Meßleitungen 18, 19 führen, liegt jetzt ein Operationsverstärker und eine integrierte Kapazität von 1 pF, die den Ausgang mit dem Eingang des Operationsverstärkers verbindet. Weiterhin liegt ein Schalter parallel zu dieser Kapazität. Von der Adressiereinheit 10 führen zusätzliche Steuerleitungen zu diesem Schalter, die ihn außerhalb der Meßzeiten geschlossen halten. In der be-

schriebenen Ausführung erzeugt ein Strom von 1 nA an den Elektroden am Ausgang des Operationsverstärkers nach 1 msec eine Spannung von 1 V. Diese Spannung wird wie in Beispiel 3 beschrieben mit Transmission-Gates auf die Meßleitungen 18, 19 geschaltet und mit dem Leseverstärker 11 gemessen.

Beispiel 5

10 Aufbau von Mikrokompartments mit vorgefertigten Polymeren

Elektrische Sensorarrays, wie sie nach Beispiel 1 bis 4 hergestellt worden sind, werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Im folgenden Schritt werden sie durch das Auflaminieren einer vorher perforierten 400 µm dicken Polypropylen-Folie mit Mikrokompartments versehen. Die Perforation entspricht dabei den Größen der Sensorarraypositionen und den Kontaktflächen an den Außenrändern. Das Auflaminieren geschieht mittels Heißsiegel-Technologie durch induktive Erwärmung. Die Justage der mittels eines Vakuumpstempels in Wafergröße aufgetragenen Folie wird mittels Justiermarken auf der Waferoberfläche durch optische Kontrolle vorgenommen. Der auf -10°C gekühlte Wafer wird entlang der vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 6

Aufbau von Mikrokompartments mit photolithographisch strukturierten Polymeren

Elektrische Sensorarrays, wie sie nach Beispiel 1-4 aufgebaut wurden, werden mit Aceton im Ultraschallbad von Schutzlack befreit und mehrmals mit Alkohol und Reinstwasser gewaschen. Anschließend werden sie im Spin coat-Verfahren mit Teflon AF (DuPont) mit einem 15 µm dicken Film beschichtet. Zuvor wird der gesamte Wafer mit dem zugehörigen Haftmittel (DuPont) benetzt. Nach Ausbacken der Teflonschicht bei 150°C für 20 Minuten werden mittels reaktivem Trockenätzen die Gebiete der Sensorpositionen und der Kontaktpads bis zu den metallischen Oberflächen freigelegt. Der Wafer wird entlang der vorgesägten Chipkanten gebrochen, so daß die einzelnen Chips erhalten werden.

Beispiel 7

50 Immobilisierung von Oligonukleotiden auf elektrischen Sensorarrays

Ein nach Beispiel 5 hergestellter Chip mit 400 µm hohen polymeren Mikrokompartments wird auf einen Keramikträger mit üblichen Leiterbahnen montiert und drahtgebondet. Durch Aufkleben eines polymeren Formteils aus Polysiloxan entlang der Chipkanten, das die aktiven Elektrodengebiete eingrenzt, wird ein Reaktionsgefäß von ca. 5 mm Durchmesser auf dem Chip befestigt. In dieses Reaktionsgefäß wird eine 5 mM Lösung von 11-Merkapto-undecanylamin in Cyclohexanon, eingefüllt, abgedeckt und bei Raumtemperatur für 5 Stunden belassen. Die Belegung der Elektroden durch Self-assembling wird kontrolliert durch eine online-Impedanz-Messung (EG&G Model 398). Die abnehmende Kapazität durch die Belegung mit der monomolekularen Molekülschicht und ist ein Maß für die Bedeckung. Die Belegung wird abgebrochen, wenn die ursprüngliche Kapazität der Chipelektroden um 70% abgesunken ist.

Diese Belegung der Metalloberflächen kann alternativ auch vor dem Brechen und Vercinzeln der Chips durch Tauchen des gesamten vorher entlackten Wafers in die analogen Lösungen vorgenommen werden.

Die mit Aminofunktionen derivatisierte Oberfläche des Chips wird anschließend mit einem Tropfen (0,1–10 µl) 20 mM 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in Essigsäureethylester (EEE) bei RT während 10–60 min inkubiert. Es wird mit EEE gewaschen und getrocknet.

Nach Waschen eines so aktivierten Chips mit neutraler Phosphatpufferlösung werden mittels Mikrokapillardosierung nacheinander in jede Sensorarrayposition je 5 nl 24mer-Oligonukleotid eingebracht, die am 5'-Terminus eine Jodoacetyl-Gruppe tragen.

Die Nucleotidsequenz ist an jeder Arrayposition unterschiedlich entsprechend der zu analysierenden verschiedenen Ziel-DNA-Moleküle. Dabei sind die Volumina der Reaktionsflüssigkeiten kleiner als das Kompartimentvolumen. Die Kopplungsreaktion erfolgt spontan während einer Stunde bei Raumtemperatur. Nach erfolgter kovalenter Anbindung wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen.

Beispiel 8

Affinitätsbindung von DNA auf elektrischen Sensorarrays mit trägergebundenen Oligonucleotiden

Auf ein nach Beispiel 7 mit unterschiedlichen Fängeroligonukleotiden beladenes elektrisches Sensorarray wird der Analyt als DNA-Gemisch aufgegeben. Es wird Analyt-DNA verwendet, in welche bei der konventionellen Vervielfältigung der DNA mittels PCR biotinylierte Primer Biotin-Reste eingeführt wurden. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5 g Ficoll, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g RSA in 0,5 l H₂O) in eine Konzentration von 1 µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6 g NaCl, 26,5 g Na-Citrat in 0,8 l H₂O) gewaschen.

Beispiel 9

Immobilisierung von partikelgebundenen affinitätsbindenden Molekülen auf elektrischen Sensorarrays

Ein elektrisches Sensorarray, das nach Beispiel 1 hergestellt und nach Beispiel 5 mit Mikrokompartments versehen wurde, wird über einem üblichen Magneten zur Handhabung magnetischer Carrier plazierte. In jedes Mikrokompartiment werden durch Mikrokapillardosierung 10 nl Flüssig-suspensionen magnetischer Polymerkügelchen mit unterschiedlichen Oligonukleotiden in appliziert und durch die Magneten am Boden der Mikrokompartments über den Elektroden fixiert. Die Beladung der magnetischen Träger erfolgte zuvor separat für alle Positionen nach einem Standardverfahren (Boehringer) durch Streptavidin/Biotin-Kopplung. Die Träger sind dabei oberflächlich mit Streptavidin beschichtet und binden die 5'-biotin-modifizierten 24mer-Nukleotide. Über die Streptavidin/Biotin-Bindung wurden unterschiedliche Oligonukleotide fest auf den magnetischen Trägern immobilisiert.

Beispiel 10

Detektion der Affinitätsbindung an Oberflächen von elektrischen Sensorarrays

Elektrische Sensorarrays mit immobilisierten Oligonukleotiden nach Beispiel 7 werden nach Hybridisierung analog Beispiel 8 zur Auslesung mittels Redox-Recycling vorbereitet. Dazu wird das gesamte elektrische Sensorarray mit 1,5 µl einer neutralen Phosphatpufferlösung des Markerenzyms alkalische Phosphatase, die als Streptavidinkonjugat vorliegt, befüllt. Die Biotin/Streptavidin-Bindung erfolgt während einer Stunde. Danach werden alle nicht gebundenen Enzymkonjugate mittels 2 mM p-Aminophenylphosphat in Phosphatpuffer pH 9,5 von der Sensoroberfläche weggespült. Nach Absaugen aller über die Mikrokompartments überstehenden Flüssigkeit wird die in jedem Mikrokompartiment durch die Enzymreaktion entstehende p-Aminophenolkonzentration, die der Menge doppelstranggebundener DNS adäquat ist, individuell mit einem 16-Kanal-Multipotentiostaten (Eigenbau) gemessen. Für das Redox-Recycling werden die Ultramikroelektroden paarweise mit 2 verschiedenen Potentialen beaufschlagt. Die Anode mit +350 mV und die Kathode mit -100 mV gegen eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode. Der anodische und der kathodische Strom jeder Arrayposition wird als Stromanstieg dI/dT an der jeweiligen Sensorposition ausgewertet. Man erhält einen Stromanstieg von 0,5 bis 2 nA pro Minute je nach Beladungsdichte. Die Summe beider Ströme ist ein quantitatives Maß für die Anzahl gebundener Ziel-DNA an jeder Arrayposition.

Die Menge gebundener DNA pro Arrayposition wird dadurch bestimmt, daß eine Arrayposition des Sensorarray als interner Standard benutzt wird. Dazu wird dem Analyten ein 35mer-Oligonukleotid, welches 20 komplementäre Basen zu dem Fängeroligonukleotid an einer Arrayposition aufweist in bekannter Konzentration beigemischt.

Beispiel 11

Detektion der Affinitätsbindung auf Oberflächen von elektrischen Sensorarrays mittels Impedanzspektroskopie

Elektrische Sensorarrays, die nach Beispiel 6 aufgebaut werden, werden an jeder Sensorarrayposition mit 10 nl Oligonukleotidlösung in einer Konzentration von 10 µg pro ml Phosphatpuffer pH 7 befüllt. Die 24mer-Oligonukleotide besitzen einheitlich 6 Thymidin-Reste am 5'-Kettenende, deren letzte 3 mit Thiolat-Gruppen modifiziert sind. Nach 12 Stunden ist die Schwefel/Gold-Bindung der Thiolatgruppen beendet.

Bei Raumtemperatur wird jede Arrayposition mittels Impedanzspektroskopie (EG&G Model 392) in einem Frequenzbereich zwischen 10 mHz und 1 MHz vermessen und die komplexe Impedanz analysiert.

Das Sensorarrays wird mit SSPE-Puffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen. Die Analyt-DNA in SSPE-Puffer wird mit Denhardt's Lösung (0,5 g Ficoll, 0,5 g Polyvinylpyrrolidon, 0,5 g RSA in 0,5 l H₂O) in eine Konzentration von 1 µg/ml überführt und auf das Sensorarray aufgegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6 g NaCl, 26,5 g Na-Citrat in 0,8 l H₂O) gewaschen.

Bei Raumtemperatur wird jede Arrayposition mittels Impedanzspektroskopie in einem Frequenzbereich zwischen 10 mHz und 1 MHz erneut vermessen und die komplexe Impedanz analysiert.

Die Differenz der Messungen an jeder Sensorarray-Position vor und nach DNA-Bindung zeigt im Falle der Erniedrigung des elektrischen Leitfähigkeitstherms der komplexen Impedanz die Position mit erfolgter DNA-Bindung an.

Beispiel 12

Transport geladener Moleküle zu Detektorelektroden des elektrischen Sensorarrays

Die Analyt-DNA in 200 mmol/l Bernsteinsäurepuffer-Puffer pH 5,1 wird mit einer Konzentration von ca. 1 µg/ml auf das Sensorarray aufgegeben.

Mit Hilfe einer externen Präzisionsstromquelle (Eigenbau) wird auf alle Elektroden 3e' und 3 ein Strom von 20 nA für 80 msec aufgeprägt. Danach wird für 80 msec auf die Elektroden 3e und 3' umgeschaltet. Die Elektroden 3 und 3' sind dabei positiv gepolt. Die gesamte Schaltsequenz wird 100 mal wiederholt. Zur Entfernung überschüssiger Analyt-DNA wird dann bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6 g NaCl, 26,5 g Na-Citrat in 0,8 l H₂O) gewaschen.

Beispiel 13

Elektrische Stringenzbehandlung von hybridisierter DNA auf elektrischen Sensorarrays

Ein elektrisches Sensorarray mit hybridisierter DNA, wie im Beispiel 12 verwendet, wird mit einer 200 mmol/l Bernsteinsäurepuffer-Puffer pH 5,1 beaufschlagt.

Mittels einer externen Stromquelle (Eigenbau) wird 10 nA Wechselstrom von 50 Hz Strom für 0,2 sec auf alle Elektrodenpaare 3, 3' aufgeprägt. Nach einer Pause von 0,2 sec wird die gesamte Schaltsequenz 100 mal wiederholt. Abdiffundierte schwächer gebundene Moleküle werden dann bei 40°C mit SSC-Puffer (52,6 g NaCl, 26,5 g Na-Citrat in 0,8 l H₂O) gewaschen.

Beispiel 14

Selektive Desorption von oberflächen gebundenen Molekülen auf elektrischen Sensorarraychips

Ein elektrisches Sensorarray wird nach Beispiel 1 hergestellt und nach Beispiel 7 mit Oligonukleotiden beladen. Dazu werden Elektrodengeometrien an den Sensorarraypositionen gemäß Fig. 2e verwendet. In den Probenring wird pH 5,1 eingefüllt.

Alle Elektroden 3 und 3' auf dem Sensorarray werden an eine Stromquelle (Eigenbau) angeschlossen. Nun wird Wechselstrom mit 20 Hz und einer Spannung von 2 V für eine Sekunde angelegt und nach einer Pause von 0,5 Sekunden erneut eingeschaltet. Diese Sequenz wird 50 mal wiederholt. Anschließend wird das elektrische Sensorarray mit SSPE-Puffer (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM Na₂EDTA, pH 7,5) gewaschen.

Die folgende Hybridisierung von Analyt-DNA erfolgt nur noch auf fängerbeladenen Elektroden 3e, 3e' und wird analog Beispiel 8 ausgeführt.

Wie in Beispiel 10 wird mit alkalischer Phosphatase markiert. Mittels Redox-Recycling messen die Elektroden 3 und 3' die p-Aminophenolkonzentration die auf den Flächen 3e, 3e' produziert wird. Dabei wird der Stromanstieg dI/dT an der jeweiligen Sensorposition ausgewertet. Man erhält einen Stromanstieg von 0,2 bis 2 nA pro Minute je nach Beladungsdichte.

Beispiel 15

Kontrolle und Meßwerterfassung eines elektrischen Sensorarrays mittels eines ASIC

Ein elektrisches Sensorarray wird analog Beispiel 15 hergestellt, mit Oligonukleotidfängern beladen und zur Affinitätsbindung von Ziel-DNA sowie folgender Enzymmarkierung verwendet. An die 32 Leitungen 6 des Sensorarrays wird ein selbstentwickelter ASIC zur seriellen Elektrodensteuerung mit 32 Schaltausgängen angeschlossen und mit einem Bipotentiostaten verbunden. Die Vorbereitung und Realisierung des Redox-Recycling werden wie nach Beispiel 10 ausgeführt. Die anodischen Potentiale von +350 mV und die kathodischen Potentiale von -100 mV werden vom Bipotentiostaten an den ASIC angelegt und über die direkten Leiterbahnen zu den einzelnen Sensorarraypositionen geleitet. Dabei ist jede Sensorarrayposition einem Schaltersystem auf dem ASIC zugeordnet. Prozessor-kontrolliert wird nun nacheinander durch den Bipotentiostaten jede Sensorarrayposition für 0,1 sec ausgelesen. Beim Umschalten einer Arrayposition von Lese- in Nichtlesezustand wird mittels ASIC das anodische und das kathodische Potential auf die jeweilige Kontaktleitung geschaltet. Alle 16 Arraypositionen arbeiten dadurch kontinuierlich im Redox-Recycling. Dieser serielle Auslesezyklus wird 5 min ausgeführt. Der Anstieg des Summenstroms pro Zeit je Arrayposition wird gemessen und wie in Beispiel 10 interpretiert.

Beispiel 16

Kontrolle und Meßfassung eines elektrischen Sensorarrays mit teilintegrierter Elektronik

Die Adressleitungen 14, 15, 16, 17 des Sensorarrays wie in Fig. 3 gezeigt werden mit einem PC-gesteuerten Decoder (Eigenbau) verbunden. An je eine der Leseleitungen 18, 19 wird ein Kanal eines 8-kanaliger Multipotentiostaten angeschlossen. Die Biasleitungen 20, 21 werden mit analogem anodischen (+350 mV) und dem kathodischen Potential (-100 mV) wie in Beispiel 15 versorgt.

Die Vorbereitung und Realisierung des Redox-Recycling werden wie nach Beispiel 10 ausgeführt.

Im Lesezustand werden alle Arraypositionen entlang der Adressleitung 14 bzw. 15 aktiviert und durch die integrierten Schalter 12 an die jeweiligen Meßkanäle des Multipotentiostaten geschaltet. Alle anderen Arraypositionen sind im Nichtlesezustand und durch die integrierten Schalter 13 mit den Biasleitungen 20 bzw. 21 verbunden, so daß auch hier die entsprechenden Potentiale an 3 bzw. 3' anliegen und die Redoxreaktion kontinuierlich abläuft.

Prozessor-kontrolliert wird nun parallel durch den Multipotentiostaten jede aktive Sensorarrayposition für 0,1 sec ausgelesen. Danach wird durch den Decoder diese Reihe mit Schalter 12 in den Nichtlesezustand versetzt und sofort die nächste Reihe mittels der nächstliegenden Adressleitungen über 13 aktiviert.

Dieser Auslesezyklus wird ca. 5 Minuten ausgeführt. Der Anstieg des Stroms pro Zeit wird für jede Sensorarrayposition separat gemessen und im PC gespeichert. Die Auswertung entspricht Beispiel 15.

Kontrolle und Meßwerterfassung eines elektrischen Sensorarrays mit integriertem Zwischenspeicher

Ein elektrisches Sensorarray wird gemäß Beispiel 4 und 5 hergestellt mit Elektrodengeometrien, die der Fig. 2c entsprechen. Die Vorbereitung des elektrischen Sensorarrays mit chemischen Komponenten erfolgt analog Beispiel 15.

Die Adressleitungen 14, 15, 16, 17 des Sensorarrays wie in Fig. 4 gezeigt werden mit einem PC-gesteuerten Decoder (Eigenbau) verbunden analog Beispiel 15. An jede der Leseleitungen 18, 19 wird ein hochempfindlicher Verstärker mit dem Ausgang an einen ADC angeschlossen. Die Biasleitungen 20, 21 werden mit analogem anodischen (+350 mV) und dem kathodischen Potential (-100 mV) aus einem Bipotentiostaten versorgt. Die Adressierung erfolgt wie im Beispiel 16.

Abweichend von diesem Beispiel wird nur der im Nichtlesezustand an den Elektroden 3 und 3' durch Redox-Recycling generierte Strom durch einen integrierten Vorverstärker mit internem Integrator 22, 23 für jede Elektrode einzeln gespeichert. Beim Lesevorgang wird bei Adressierung nur der Inhalt dieses Integrators abgefragt.

Das dort ablaufende Redox Recycling generiert Strom, der über den internen Verstärker in 23 zum internen positionsspezifischen Integrator in 23 geleitet und dort aufsummiert wird. Die Aufsummation geschieht während des gesamten Nichtlesezustandes.

Patentansprüche

1. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle, gekennzeichnet durch die folgenden Merkmale:

- Anordnung von mehr als 2 Sensorpositionen auf planaren Trägern bestehend aus lokal separierten mindestens paarweise angeordneten Arrays von Ultramikroelektroden und wahlweise angeordneten Hilfsselektroden;
- individuelle elektrische Adressierung jeder Sensorposition;
- kontinuierliche elektrochemische Kontrolle an jeder Sensorposition;
- wahlweise Erzeugung elektrischer Gleich- und/oder Wechselfelder auf jeder Sensorposition;
- individuelle Detektion unterschiedlicher elektrochemischer Reaktionen oder Eigenschaften bzw. elektrische Auslesung solcher vorangegangenen Ereignisse an jeder Sensorposition;
- Immobilisierung unterschiedlicher oder gleicher affinitätsbindender Moleküle wahlweise auf den Sensorpositionen oder an partikulären Trägern oder in Gelen über den Sensorpositionen unabhängig von optischen Eigenschaften.

2. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der planare Träger aus Silizium, Glas, Keramik oder Kunststoff besteht.

3. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikro- und Hilfsselektrodenoberflächen aus Edelmetallfilmen wie Gold oder Platin oder Iridium oder aus Kohlenstoff bestehen.

4. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen

Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikro- und Hilfsselektrodenoberflächen aus unterschiedlichen Materialien bestehen können.

5. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß jede einzelne Sensorposition auch mit einem oder mehreren Ultramikroelektrodenpaaren gleicher oder verschiedener Geometrie bestückt ist.

6. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die paarweise angeordneten Ultramikroelektroden als interdigitale Fingerelektroden oder als mit punktförmigen Ultramikroelektroden bedeckte Flächen oder Interdigitalanordnungen oder spiral- oder kreisförmig angeordnete Bandstrukturen angeordnet sind.

7. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die paarweise angeordneten Ultramikroelektroden nach Anspruch 6 wahlweise auch mehrschichtig als von Isolatorschichten getrennte bandförmige Metallfilme vertikal gestapelt werden.

8. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder einzelnen Sensorposition neben den Ultramikroelektroden wahlweise zusätzlich weitere flächige oder strukturierte Elektroden, die kein Ultramikroelektrodenverhalten aufweisen müssen und/oder unkontaktierte metallische Flächen angeordnet werden.

9. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorpositionen von Flüssigkeiten bedeckt sind und Reagenzien, Analyte oder Analytgemische jeder einzelnen Sensorposition oder allen Sensorpositionen gleichzeitig zugeführt werden.

10. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß an den einzelnen Sensorpositionen affinitätsbindende Moleküle auch mit unterschiedlicher Spezifität auf den einzelnen Elektroden und/oder auf metallischen Hilfsflächen und/oder auf Flächen des Trägers und/oder Kompartimentwandungen so immobilisiert sind, daß voltametrische oder impedimetrische Meßverfahren mit den Ultramikroelektroden ausgeführt werden.

11. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß an den einzelnen Sensorpositionen affinitätsbindende Moleküle, die auf den Ultramikroelektroden gebunden wurden, durch Desorption oder elektrochemische Oxidation wieder entfernt werden.

12. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine voltametrische De-

tektion in flüssigen Analyten unabhängig von partikulären Bestandteilen und/oder aufliegenden Gelen und/oder anhaftenden Substanzen vorgenommen wird.

13. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine impedimetrische Detektion in flüssigen Analyten unabhängig von schwebenden partikulären Bestandteilen vorgenommen werden kann.

14. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder Sensorposition individuelle molekulare Bindungsereignisse elektrochemisch detektiert werden, nachdem Analyte aus Stoffgemischen an die auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle spezifisch gebunden worden sind.

15. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder Sensorposition individuell das Ausbleiben molekularer Bindungsereignisse detektiert wird, nachdem Analyte aus Stoffgemischen mit den auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Molekülen keine spezifische Bindung eingegangen sind.

16. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß an jeder Sensorposition individuelle molekulare Bindungsereignisse nach Bindung von Analyten aus Stoffgemischen an die auf oder über den Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle dadurch mit den Ultramikroelektroden detektiert werden, daß redoxaktive Reaktionsprodukte bindungsspezifisch eingebrachter Enzymmarker qualitativ und/oder quantitativ erfaßt werden.

17. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Ultramikroelektroden und gegebenenfalls zusätzliche Elektroden an jeder einzelnen Sensorposition mittels elektronischer Schaltungen so adressiert und elektrochemische Ereignisse so ausgelesen werden, daß Potentiale zur Polarisierung der Elektroden ohne Unterbrechung bestehen bleiben und eine elektrische Doppelschicht an den flüssigkeitsbenetzten Elektroden nicht beeinflußt wird.

18. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays gleichzeitig geeignet zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß integrierte Schaltungen für das Analyseverfahren im aus Silizium bestehenden planaren Träger hergestellt werden.

19. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß bei serieller Auslesung des Arrays elektrochemische Vorgänge, die an den Ultramikroelektroden und gegebenenfalls zusätzlichen Elektroden an jeder einzelnen Sensorposition in der Zeit zwischen individuellen Auslesevorgängen ablaufen, individuell erfaßt und gespeichert und/oder aufsummiert werden.

20. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen

Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Sensorpositionen durch volumenseparierende Kompartments so abgetrennt sind oder mechanisch abgetrennt werden können, daß eine positionsspezifische quantitative elektrochemische Detektion möglich ist.

21. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß Ultramikroelektroden aus Edelmetall und wahlweise weitere flächige oder strukturierte Elektroden und/oder unkontaktierte metallische Flächen gleichzeitig als Immobilisierungsflächen für Self-assembling-Monoschichten unterschiedlicher thiolmodifizierter affinitätsbindender Moleküle auf den verschiedenen Sensorpositionen genutzt werden.

22. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausbildung von Self-assembling-Monoschichten so ausgeführt wird, daß auf allen Sensorpositionen eine gleichartige Beschichtung mit bifunktionellen thiolmodifizierten Molekülen vorgenommen wird, die in einem zweiten Reaktionsschritt zur Bindung gleicher oder unterschiedlicher affinitätsbindender Moleküle auf jeder einzelnen Sensorposition genutzt werden.

23. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Anspruch 20 und 21 an den einzelnen Sensorpositionen immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle mit einer Schicht aus Hydrogelen belegt werden, die wahlweise auch das gesamte elektrische Sensorarray bedecken kann.

24. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß in die Kompartments an den einzelnen Sensorpositionen unterschiedliche affinitätsbindende Moleküle, die an Polymere oder an Nanopartikel aus Metallen oder mineralischen Stoffen oder in gelartigen Substanzen trägergebunden sind, eingebracht und fixiert werden.

25. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die an einzelnen Sensorpositionen eingebrachten und an partikulären Trägern immobilisierten affinitätsbindenden Moleküle zusätzlich in einer Schicht aus Hydrogelen fixiert werden, die wahlweise auch das gesamte elektrische Sensorarray bedecken kann.

26. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Ultramikroelektrodenpaaren der verschiedenen Positionen des elektrischen Sensorarrays, wahlweise unter Einbeziehung der Hilfselektroden des Sensorarrays, solche elektrischen Felder erzeugt werden, daß geladene Moleküle nach elektrophoretischen Prinzipien bewegt werden.

27. Elektrisches Sensorarray zur elektrochemischen Detektion molekularer Assays und zum Transport geladener Moleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 26,

dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Ultramikroelektrodenpaaren der verschiedenen Positionen des elektrischen Sensorarrays, wahlweise unter Einbeziehung der Hilfselektroden des Sensorarrays, solche elektrischen Wechselfelder erzeugt werden, daß gebundene Analytmoleküle abhängig von Bindungsstärke und Ladung von den einzelnen Sensorpositionen entfernt werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

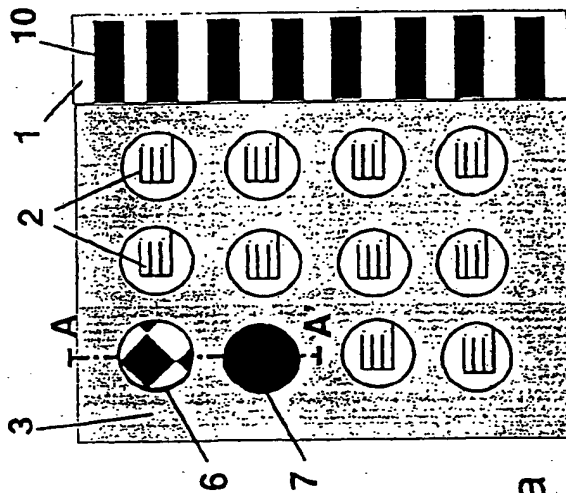


Fig. 1a

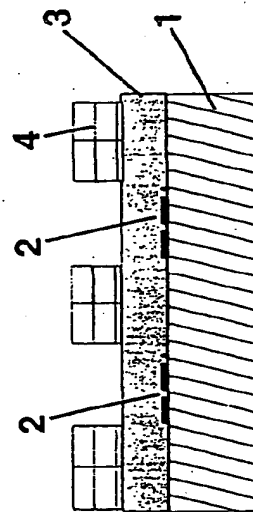


Fig. 1b

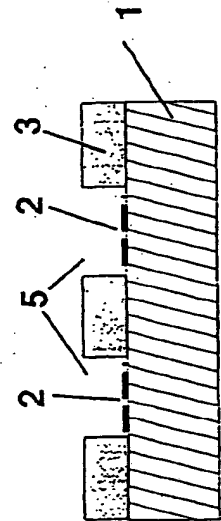


Fig. 1c

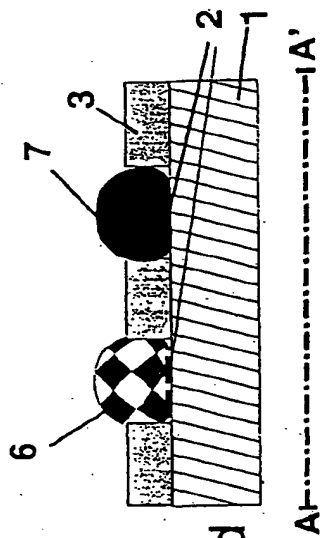


Fig. 1d

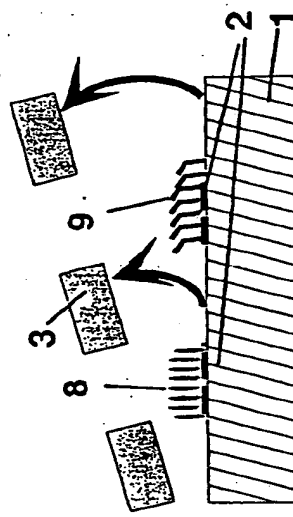


Fig. 1e

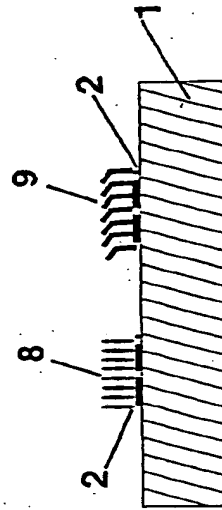


Fig. 1f

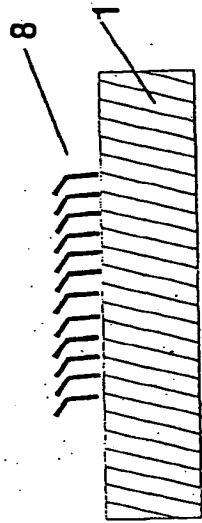


Fig. 2d

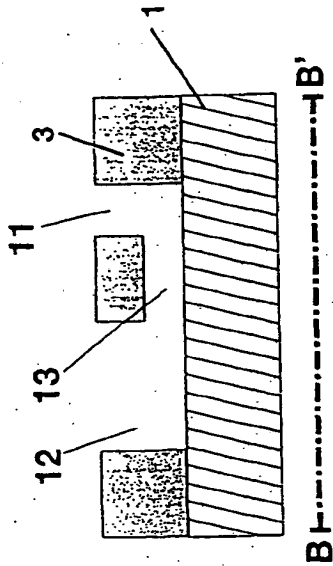


Fig. 2a

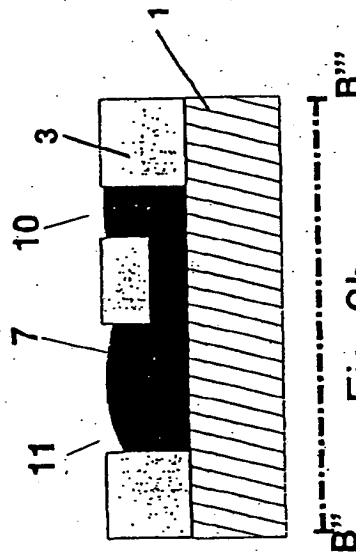


Fig. 2b

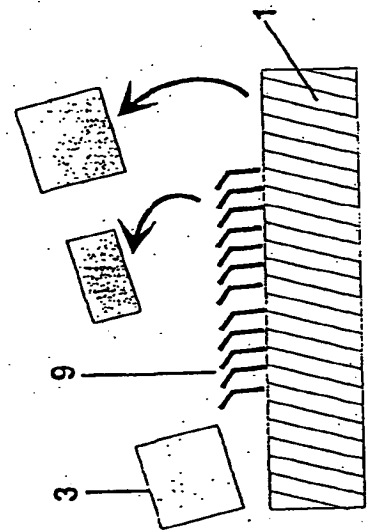


Fig. 2c

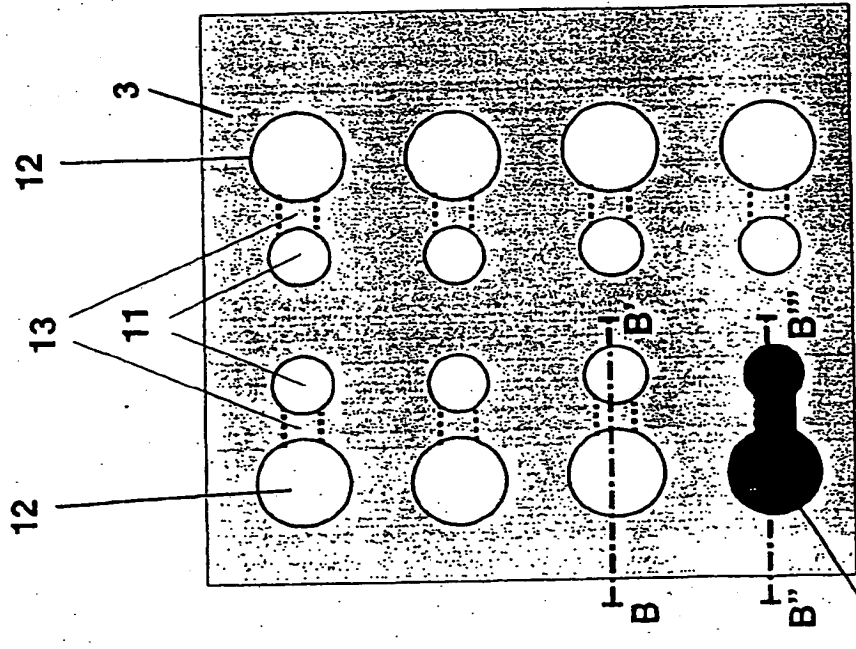


Fig. 2e

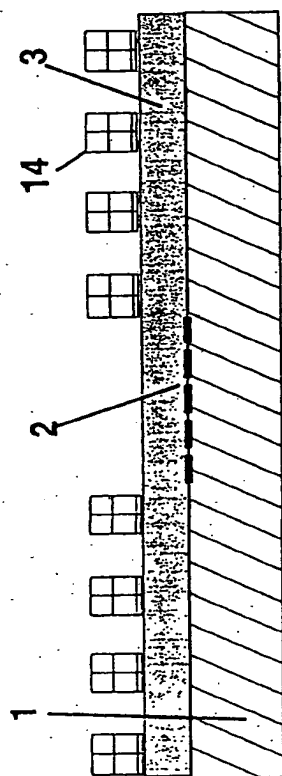


Fig. 3b

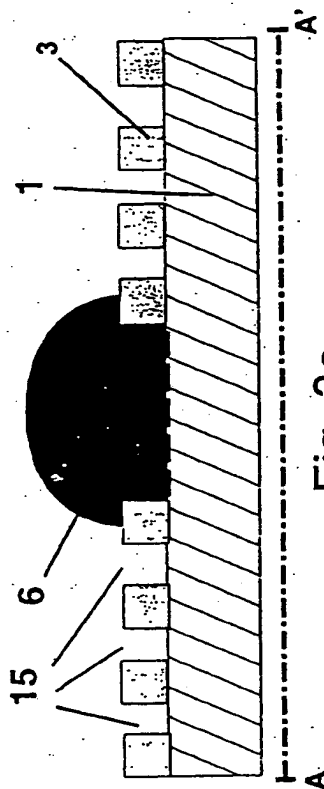


Fig. 3c

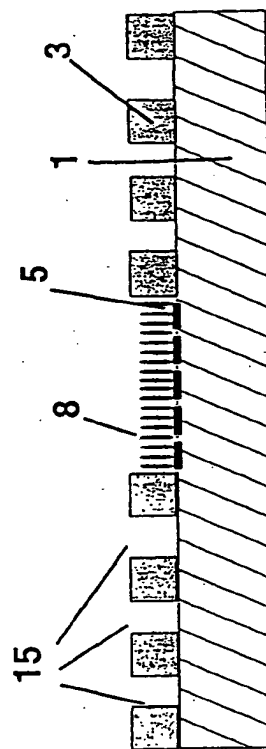


Fig. 3d

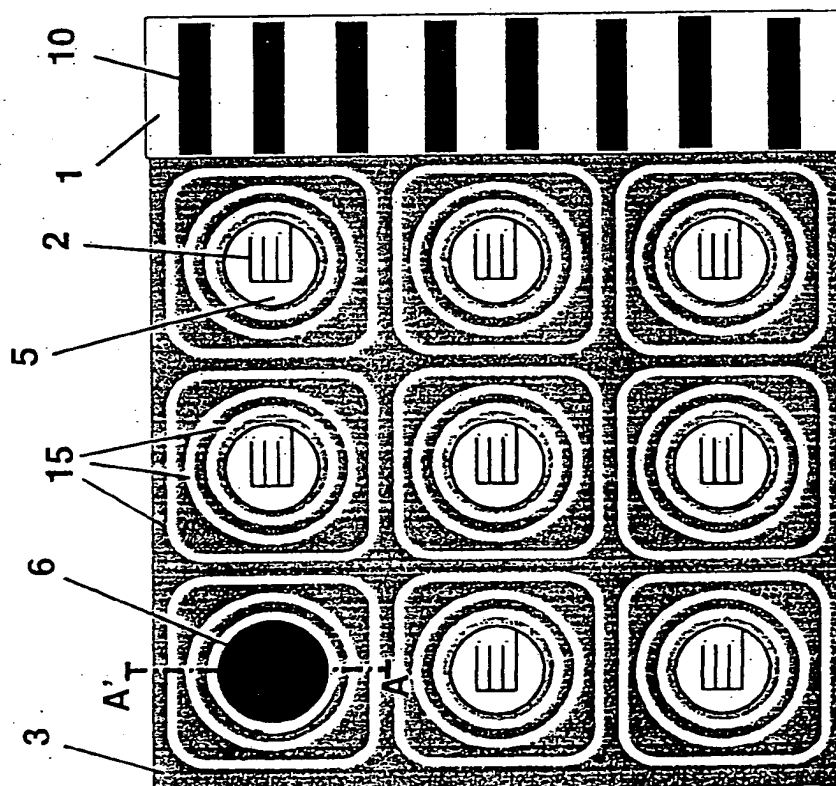


Fig. 3a

Fig. 4a

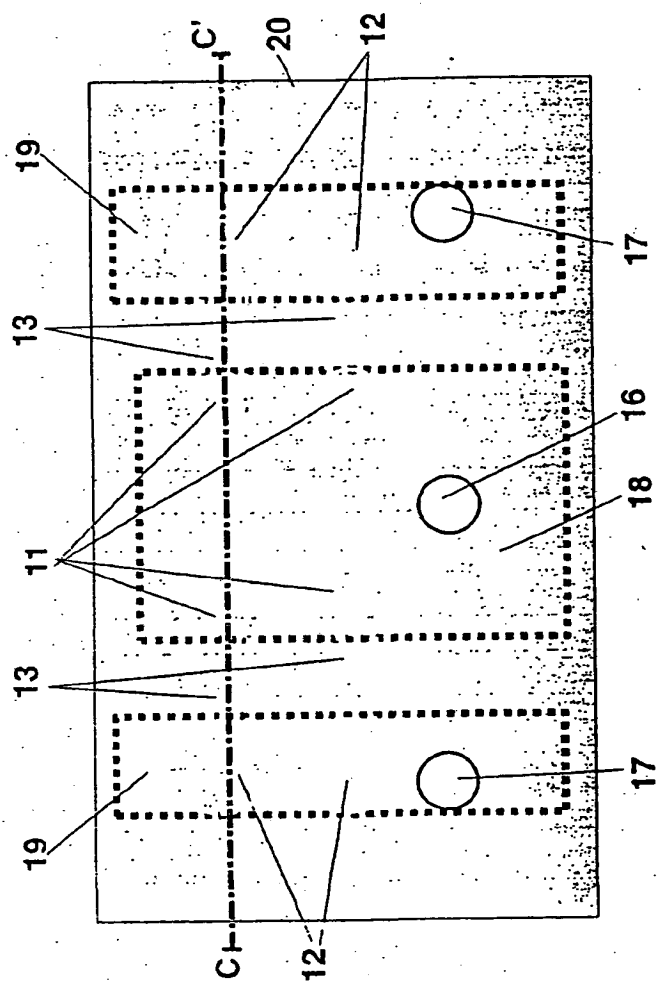


Fig. 4b

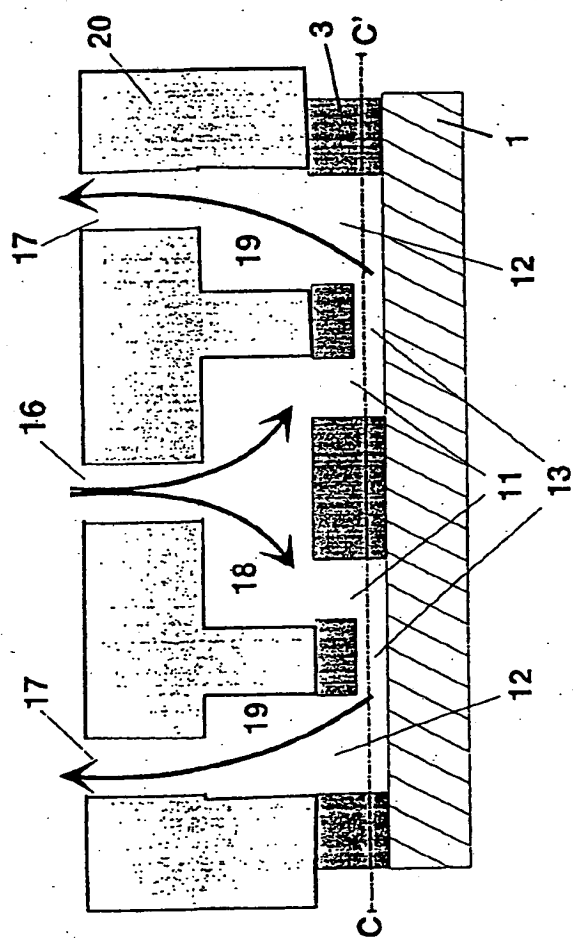
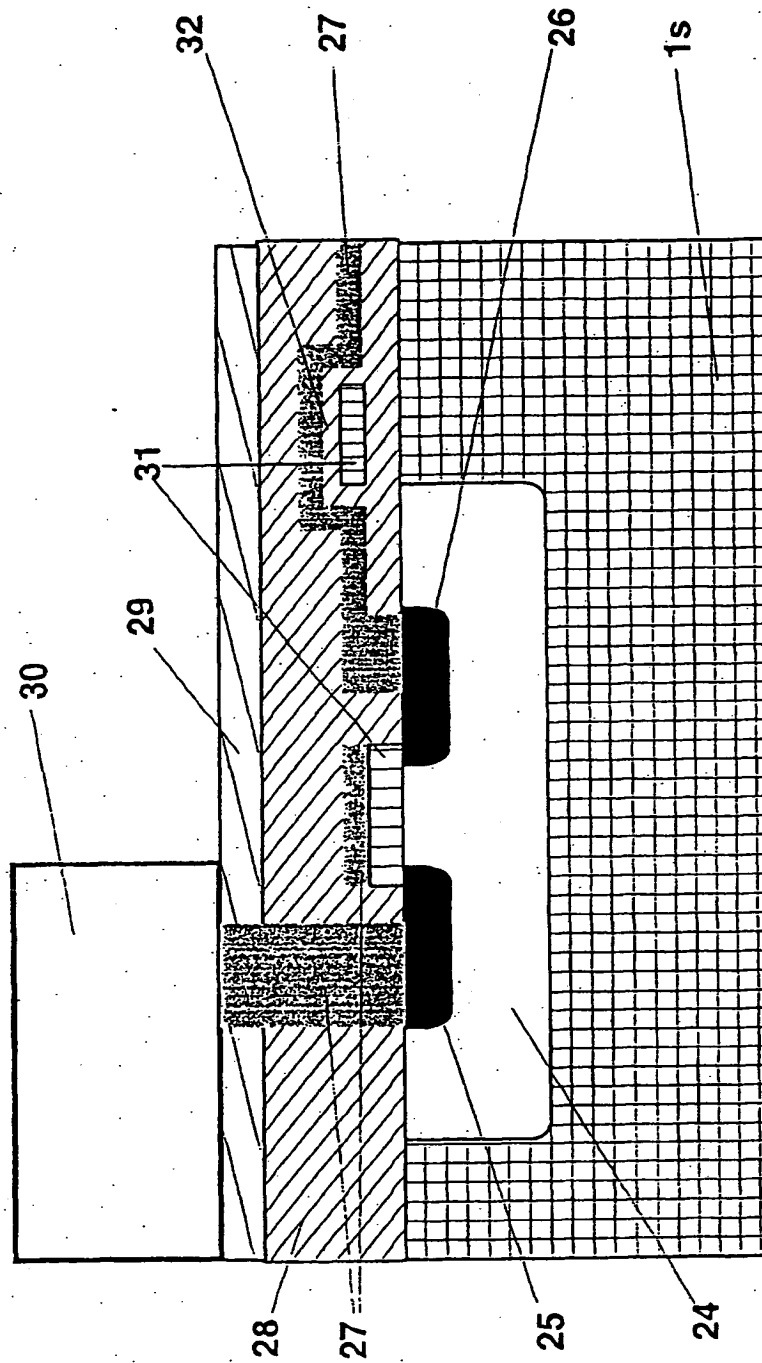


Fig. 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.